

**MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2015/2016**

**OCORRÊNCIA E PERSISTÊNCIA DOS ANTIBIÓTICOS NOS SOLOS**

**PAULA ADRIANA BARBOSA FERREIRA PENÊDA**

Dissertação submetida para obtenção do grau de

**MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE**

**Presidente do Júri:** Manuel Fernando Ribeiro Pereira  
(Professor Associado do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da  
Universidade do Porto)

---

**Orientador académico:** Lúcia Maria da Silveira Santos  
(Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da  
Universidade do Porto)

*Junho, 2016*



*Apesar das ruínas e da morte,  
Onde sempre acabou cada ilusão,  
A força dos meus sonhos é tão forte,  
Que de tudo renasce a exaltação  
E nunca as minhas mãos ficam vazias.*

In Poesia, Sophia de Mello Breyner



## Agradecimentos

Queria agradecer a todos aqueles que contribuíram para que a realização desta dissertação fosse possível.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, a Professora Lúcia Santos, por me ter desafiado a agarrar esta experiência e por testar e aperfeiçoar todas as minhas capacidades, pois graças à sua persistência e dedicação fui capaz de alargar os meus horizontes e de enriquecer os meus conhecimentos nos mais diversos temas.

Queria também mostrar a minha gratidão pelo enorme ajuda que me foi proporcionada pela Isabel Carvalho, que incansavelmente fez os possíveis e os impossíveis por estar sempre presente e partilhar experiências. Sem a sua inesgotável dedicação a realização desta dissertação não teria sido possível. A ela um enorme Obrigado!

Pretendo demonstrar, também, o meu reconhecimento e agradecimento a todos os membros do laboratório MIA201 pela disponibilidade em ajudar, ao Leandro, à Mariana, à Doutora Vera, à Sara e à Daniela, a minha gratidão por estarem sempre prontos a ajudar e a partilhar experiência laboratorial, e à Marta Xavier, à Raquel Costa, à Joana Aguiar, ao Hugo Ribeiro e ao Rodrigo Soares, os meus colegas de dissertação, por sempre proporcionaram um excelente ambiente de trabalho e me apoiaram e ajudaram sempre que foi preciso.

Por fim, queria agradecer aos meus pais, Gabriela e José Carlos Penêda, por me proporcionarem uma vida recheada de conhecimento e por sempre me apoiarem em tudo, e aos meus irmãos, José Carlos e Gabriela Penêda, pela enorme cumplicidade e carinho. Queria também agradecer à Joana Oliveira, a minha cunhadinha, pela paciência, pela dedicação e pela ajuda nas traduções.

Pretendo também enaltecer e agradecer o enorme apoio, paciência e compreensão da minha melhor amiga, Joana Duarte, por viver comigo todos os momentos de aperto, me dar força e me apoiar em tudo incondicionalmente. Obrigada pela tua sincera e eterna amizade.

Aos amigos de sempre e para sempre, o *Happy Group*, um grande, grande obrigado por estarem sempre presentes e preencherem a minha vida de felicidade.

À minha avó, Maria da Conceição Oliveira, esteja ela onde estiver, quero agradecer por tudo o que foi e fez por mim, e prometer-lhe que farei sempre de tudo para eternizar a sua frase ‘as grandes batalhas fazem grandes mulheres’. Por isso, esta é para ti, Avó.

---

Este trabalho foi financiado pelos projetos POCI-01-0145-FEDER-006939 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE e NORTE-01-0145-FEDER-000005 - LEPABE-2-ECO-INNOVATION, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.



## Resumo

Há algumas dezenas de anos que os antibióticos são usados em medicina humana e veterinária para combater variadas estirpes de microrganismos. Estes compostos, após serem excretados pelos seres humanos e animais aparecem livremente no ambiente, contaminando água e solo. Por este motivo, os elevados níveis de concentração destes compostos nos solos levou-os a serem considerados como poluentes emergentes. A ocorrência e a persistência dos antibióticos na água e no solo é um dos temas com maior enfoque na atualidade, com o intuito de precaver os possíveis impactes da contaminação ambiental. É previsível que ainda durante este ano seja implementada legislação para a proteção do solo em Portugal.

O primeiro objetivo deste trabalho foi desenvolver, otimizar e validar um método analítico que permitisse quantificar os dois antibióticos de estudo - o metronidazol e a sulfametoxazol, com utilização quer em medicina humana quer em medicina veterinária - em amostras de solo. O método desenvolvido foi a cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC*) com deteção por arranjo de díodos (*DAD*), para análise dos analitos mencionados em água da torneira e água de rio. O intervalo de linearidade das curvas de calibração foi de 50 - 500 µg/L para o metronidazol e de 20 - 500 µg/L para a sulfametoxazol. A precisão foi avaliada pela repetibilidade (1,1 - 7,6%) e pela precisão intermédia (2,2 - 5,3%). A percentagem de recuperação dos analitos em água da torneira variou entre 98 e 103% e em água de rio entre 96 e 102,7%.

Para se proceder à análise por *HPLC-DAD* foi necessário realizar à priori o *clean-up* e a pré-concentração dos analitos e da amostra através de um método extrativo. Tratando-se de amostras sólidas foi necessário recorrer a um método de extração que permitisse a retenção dos antibióticos numa fase líquida. Como tal, recorreu-se ao *SPE* para proceder à extração dos antibióticos de interesse. No entanto este método não permitiu a extração do metronidazol e da sulfametoxazol dado que não foi eficaz no *clean-up* da amostra. Testou-se então o método de extração *QuEChERS* (*Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), otimizando alguns parâmetros como a variação do solvente de extração e do pH (1,9, 4,1 e 6,7). O método mostrou-se eficaz no *clean-up* da amostra, embora os valores das percentagens de recuperação obtidas tenham variado entre 14,1 e 55,3%, ou seja, relativamente baixas. As melhores percentagens de recuperação (próximo de 50%) foram atingidas para a metodologia que utilizou como solvente de extração acetoneitrilo:metanol (50:50, v/v) sem acidificação. Apesar dos baixos valores de recuperações obtidas o método permitiu a extração dos antibióticos em estudo.

A não existência de legislação para os níveis de concentração de antibióticos nos solos está a permitir graves negligências ambientais, visto que os antibióticos são libertados no ambiente sem qualquer tipo de controlo ou punição. Assim, esta problemática deve ser divulgada e alertada. Não só está em risco a saúde humana a longo prazo, está a aumentar o número de bactérias resistentes a antibióticos, como a curto prazo, está a comprometer-se a qualidade dos produtos que ingerimos.

**Palavras-Chave:** antibióticos; medicina humana; medicina veterinária; sulfametoxazol; metronidazol; extração *SPE*; extração *QuEChERS*; *HPLC-DAD*; resistência microbiana; ambiente.

## Abstract

Antibiotics have been used for decades in human and veterinary medicine to fight several microorganisms strains. These compounds are excreted by humans and animals to soil and water. Thereafter they are considered emergent pollutants. Occurrence and persistence of antibiotics on water and soil have been extensively studied nowadays given the major impact on environmental contamination. Moreover, it's expected that soil legislation to be implemented during the current year in Portugal.

Our main goal was to develop, optimize and validate an analytic method to quantify the two studied antibiotics (metronidazole and sulfamethoxazole, used both in human and veterinary medicine) on soil samples. We used High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD) to analyse tap and river water. Calibration curves linear range was 50-500 µg/L for metronidazole and 20 - 500 µg/L for sulfamethoxazole. Precision was evaluated through repeatability (1,1-7,6%) and intermediate precision (2,2-5,3%). Analits' recovery percentage in tap water ranged between 98% and 103% and in river water from 96% to 102,7%.

To use HPLC-DAD we previously did *clean-up* and sample pre-concentration of the sample using an extractive method. Since we dealt with solid samples it was necessary to used an extraction method that allowed antibiotic retention in a liquid phase. To do so, SPE was tested. However, it wasn't effective on sample clean-up. Then we tested QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), optimizing parameters such as solvent extraction variation and pH values (1,9, 4,1, 6,7). This was effective on sample clean-up despite relatively low recovery values (14,1-55,3%). Highest recovery values (50%) were achieved using acetonitrile:methanol (50:50, v/v) as extraction solvent with no acidification. Despite low recovery vales this method allowed extraction of the studied antibiotics.

Lack of legislation concerning antibiotic soil concentration implies serious environmental threats, since antibiotics are being disposed without control or legislation. Not only is public heath being threatened on the long term, due to the growing bacteria resistance to antibiotics, but also on short term, since food quality is being compromised.



# Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.



# Índice

<b>1</b>	<b>Enquadramento .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Antibióticos .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Definição e evolução histórica .....	3
2.1.2	Classificação e caracterização físico-química .....	4
2.1.3	Consumo .....	6
2.1.4	Antibióticos no meio ambiente .....	8
2.1.5	Resistência.....	12
<b>2.2</b>	<b>Métodos Analíticos.....</b>	<b>15</b>
2.2.1	Métodos de extração .....	15
2.2.2	Métodos instrumentais .....	18
<b>3</b>	<b>Casos de Estudo .....</b>	<b>23</b>
3.1	Metronidazol.....	23
3.2	Sulfametoxazol.....	24
<b>4</b>	<b>Estado da Arte.....</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Descrição Técnica .....</b>	<b>37</b>
5.1	Materiais e Reagentes.....	37
5.2	Metodologias Analíticas .....	37
5.2.1	Métodos instrumentais .....	37
5.2.2	Amostragem .....	38
5.2.3	Métodos de extração .....	38
5.3	Armazenamento, Destino e Tratamento de Resíduos .....	41
<b>6</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>43</b>
6.1	Validação do método analítico .....	43
6.1.1	Linearidade e limites de deteção e quantificação .....	44
6.1.2	Precisão .....	45
6.1.3	Exatidão.....	45
6.2	Extração.....	46
<b>7</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Limitações e Trabalho Futuro .....</b>	<b>53</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>- Material Complementar à Introdução .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>- Material Complementar à Discussão de Resultados .....</b>	<b>64</b>

# Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das principais classes de antibióticos.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabela 2 - Diferentes coeficientes de partição e dispersão relevantes no estudo de antibióticos em solos .....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 3 - Propriedades do Metronidazol .....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 4 - Propriedades Sulfametoxazol .....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 5 - Métodos para extração e análise de antibióticos em matrizes de solo .....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 6 - Condições utilizadas nas diferentes metodologias de QuEChERS .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 7 - Parâmetros analíticos.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 8 - Resultados do estudo da precisão do método analítico .....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 9 - Resultados do estudo da exatidão do método analítico em água da torneira e água de rio.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 10 - Percentagens de recuperação obtidas nos diferentes ensaios de QuEChERS para o metronidazol .....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 11 - Percentagens de recuperação obtidas nos diferentes ensaios de QuEChERS para a sulfametoxazol .....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 12 - Forma iônica ou neutra do metronidazol e da sulfametoxazol aos diferentes valores de pH.....</i>	<i>49</i>

# Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Acontecimentos históricos marcantes na descoberta dos antibióticos .....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2 - Consumo de antibióticos por classe entre 2000 e 2010 .....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 3 - Consumo de antibióticos em medicina humana nos países europeus no ano de 2014 .....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 4 - Consumo de antibióticos por ano, em média, num país europeu para medicina humana e para medicina veterinária (dados 2010 e 2012) .....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 5 - Fontes de contaminação de antibióticos no solo.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 6 - Método SPE: opção de retenção dos analitos.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7 - Etapas de aplicação para o método QuEChERS.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8 - Sistema representativo do funcionamento em HPLC.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 9 - Detetor de um único comprimento de onda convencional (A) e detetor de múltiplos comprimentos de onda (B).....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 10 - Esquema do funcionamento de um detetor MS.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 11 - Estrutura química, diagrama de especiação e respetivos <math>pK_a</math> do metronidazol.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 12 - Equilíbrio de ionização do metronidazol .....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 13 - Estrutura química e diagrama de especiação da Sulfametoxazol.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 14 - Equilíbrio de ionização da Sulfametoxazol.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 15 - Esquema do procedimento de pré-tratamento e extração SPE aplicado.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 16 - Esquema do procedimento de QuEChERS aplicado .....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 17 - Cromatograma obtido da análise HPLC-DAD de uma solução padrão de 500 <math>\mu\text{g/L}</math> de vários antibióticos.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 18 - Curvas de calibração metronidazol e sulfametoxazol .....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 19 - Cromatograma obtido da análise HPLC-DAD de uma amostra de solo contaminada com uma solução mix de 500 <math>\mu\text{g/L}</math> após extração por SPE .....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 20 - Cromatograma obtido da análise HPLC-DAD de uma amostra de solo contaminada com uma solução mix de 500 <math>\mu\text{g/L}</math> após extração por QuEChERS (ensaio 3') .....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 21 - Estrutura do PSA.....</i>	<i>50</i>



# Notação e Glossário

a	Declive da curva de calibração
ACN	Acetonitrilo
ARG	<i>Antibiotic resistance genes</i> (em português, genes de resistência a antibióticos)
b	Interceção da curva de calibração
C18	<i>Octadecyl bonded silica</i>
CH <sub>3</sub> COOH	Ácido acético
CH <sub>3</sub> COONa	Acetato de sódio
DAD	<i>Diode array detector</i> (em português, detetor de arranjo de díodos)
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DGV	Direção Geral de Veterinária
dSPE	<i>Dispersive solid phase extraction</i> (em português, mico-extração em fase sólida)
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENV+	<i>Environmental+</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (em português, ionização electrospray)
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
EU	União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
FEDESA	<i>European Federation of Animal Health</i>
GS	<i>Gas chromatography</i>
HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>
HCOOH	Ácido fórmico
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (em português, cromatografia líquida de alta eficiência)
$K_d$	Coefficiente de distribuição
$K_{oc}$	Coefficiente de partição carbono orgânico-água
$K_{OW}$	Coefficiente de partição octanol-água
LC	<i>Liquid chromatography</i> (em português, cromatografia líquida)
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i>
LOD	<i>Limit of detection</i> (em português, limite de deteção)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (em português, limite de quantificação)
LS	<i>Liquid chromatography</i>
mAUI	<i>Mili arbitrary unit</i>
McIlvaine	<i>Tampão composto por hidrogeno fosfato dissódico e ácido cítrico</i>
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
METRO	Metronidazol
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MIP	<i>Molecularly imprinted polymers</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> (em português, espetrometria de massa)
Na <sub>2</sub> Cit	<i>Citrato dissódico</i>
Na <sub>2</sub> EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico

---

NaCit	Citrato de sódio
NaCl	<i>Cloreto de sódio</i>
ND	<i>No detection</i>
NH <sub>3</sub>	<i>Amoníaco</i>
NQ	<i>Not quantifiable</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pK <sub>a</sub>	Constante de dissociação ácida
PSA	<i>Primary secondary amine</i>
PTFE	<i>Politetrafluoretileno</i>
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
R	Coeficiente de correlação
RSD	<i>Relative Standard derivation</i> (em português, desvio-padrão relativo)
S/N	<i>Signal-to-noise ratio</i> (em português, rácio sinal-ruído)
s <sub>a</sub>	Desvio-padrão do declive
s <sub>b</sub>	Desvio-padrão da interceção
SPB	<i>Tampão de fosfato de sódio</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (em português, extração em fase sólida)
SPLE	Selective pressurised liquid extraction
STARE	<i>Stopping Antibiotic Resistance Evolution</i>
SULFA	Sulfametoxazol
TCA	Ácido tricloroacético
ts <sub>a</sub>	Intervalo de confiança do declive
ts <sub>b</sub>	Intervalo de confiança da interceção



# 1 Enquadramento

Hoje em dia, milhares de antibióticos naturais e sintéticos são usados para tratar doenças infecciosas, quer em medicina humana, quer em medicina veterinária, aparecendo livremente no meio ambiente (Thiele-Bruhn 2003). Na última década, foram encontrados diversos antibióticos em recursos hídricos, efluentes industriais, lamas de ETAR's, estrumes de animais, solo, plantas e organismos, espalhados por todo o mundo (Gothwal and Shashidhar 2015). A recorrência destes compostos era tal que foram mesmo considerados como poluentes do solo emergentes (Schwarz *et al.* 2012).

Foram então definidas duas principais vias de introdução de antibióticos no ambiente: a medicina humana e a medicina veterinária (Li 2014).

No que diz respeito aos antibióticos utilizados em medicina humana existem variadas formas dos mesmos entrarem no ambiente, sendo de destacar: os sistemas de esgotos domésticos, os efluentes hospitalares, os escoamentos agrícolas, os processos industriais e a eliminação de resíduos (aterros) (Kümmerer 2008; Batchu *et al.* 2014). Uma outra via de proliferação destes compostos no ambiente que ganhou maiores proporções atualmente tem origem nas estações de tratamento de águas residuais, nomeadamente através das lamas de depuração. Como o tratamento efetuado não consegue degradar/remover este tipo de compostos eles aparecem quer nas lamas resultantes do tratamento biológico quer nas águas residuais já tratadas (Kemper 2008).

Tendo em consideração os antibióticos, bem como os seus metabolitos ou produtos de degradação, com origem em medicina veterinária, estes aparecem no solo quando se aplicam grandes quantidades de estrume em áreas de intenso cultivo, nomeadamente solos de cultivo de vegetais (Kemper 2008). Esse estrume contém alguns antibióticos ingeridos pelos animais aquando da sua criação que se fixam no solo tornando-se altamente persistentes. A incidência constante em zonas de cultivo aumenta a atividade bacteriana no solo, que origina o aparecimento de genes de resistência. Este aumento de resistência põe em risco a saúde de toda a população e outros indivíduos que se alimentam dessas culturas, dado que a contaminação se vai propagando ao longo da cadeia trófica (Shi *et al.* 2016).

Assim, de uma forma sintética, os organismos como os seres humanos e os animais ingerem diversos antibióticos a fim de combater certas estirpes de bactérias, os quais são mais tarde excretados para o ambiente exterior. Após entrada no meio estes compostos repartem-se em dois estados principais - a água e o solo. Os compostos são então incorporados nas plantas que os absorvem aquando das suas reações metabólicas. Subindo na cadeia alimentar dar-se-á a transmissão para os animais e para os humanos e todo o ciclo se reinicia.

Devido às contaminações cada vez maiores nos solos, várias formas de eliminar os antibióticos têm sido estudadas, tais como, a sorção, a foto-degradação, a biodegradação e a oxidação (Gothwal and Shashidhar 2015). Isto porque a criação de resistência a compostos que são utilizados para combater doenças/vírus reduz a eficácia dos mesmos resultando em desvantagens na utilização terapêutica destes antimicrobianos (Kemper 2008).



## 2 Introdução

### 2.1 Antibióticos

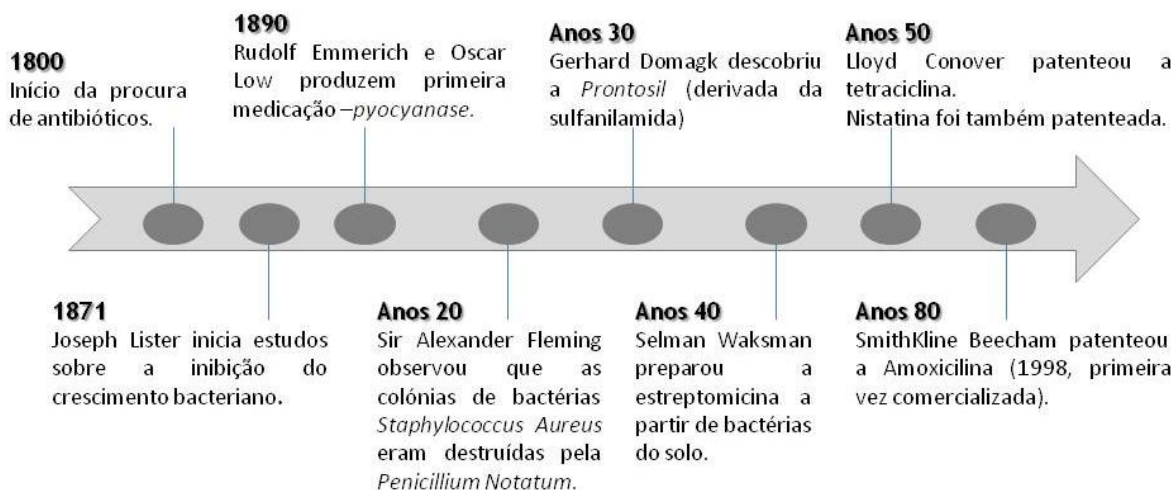
#### 2.1.1 Definição e evolução histórica

Um antibiótico pode ser definido como um agente de regulação química natural, desenvolvido a partir de fungos, bactérias ou elementos sintéticos, que restringe ou anula o crescimento dos organismos, mais concretamente de microrganismos mono e pluricelulares causadores de infeções no organismo (Gottlieb 1976). São substâncias bioativas que têm como principal vantagem a eficácia e a rapidez com que atuam em doses muito baixas por administração oral ou intracorporal, sendo excretadas após um curto período de tempo de residência (Thiele-Bruhn 2003; Kemper 2008). Contudo, apresentam uma grande desvantagem porque não são compostos completamente metabolizados no organismo (Kemper 2008).

Atualmente é possível identificar diferentes tipos de antibióticos, os quais podem ser classificadas com base na sua estrutura química, mecanismo de ação, espectro de ação e via de administração (Kemper 2008; Peysson and Vulliet 2013).

Classificando os antibióticos quanto a sua estrutura química temos: as tetraciclinas, as sulfonamidas, os aminoglicosídeos, os  $\beta$ -lactâmicos, os macrolídeos, os aminoglicosídeos, as quinolonas, os imidazóis, os polipeptídeos, entre outros grupos de menor relevo (Gothwal and Shashidhar 2015; Vardanyan, R.; Hruby 2016). Os  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina e penicilina) são os antibióticos mais utilizados na medicina humana (Huang 2001; Li 2014).

Mas importa perceber como estes compostos foram assumindo tal preponderância, o que facilmente se compreende abordando a evolução dos antibióticos ao longo dos vários anos. É de notar que nos primórdios destas substâncias na América Central, os egípcios, os chineses e os índios utilizavam modelos de antibióticos para tratar ferimentos, no entanto, não conseguiram estabelecer a ligação entre as propriedades antibacterianas desses modelos e o tratamento de doença (Cook *et al.* 1989). Contudo, ao longo dos tempos vários passos foram dados na descoberta de novos antibióticos e na compreensão das suas funcionalidades, como demonstrado na Figura 1 (e na Tabela A1 1 apresentada no Anexo 1).



**Figura 1 - Acontecimentos históricos marcantes na descoberta dos antibióticos (baseado em Aminov *et al.* 2010)**

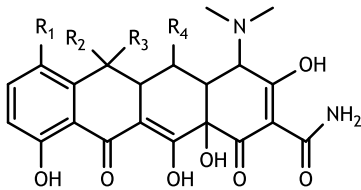
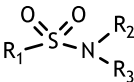
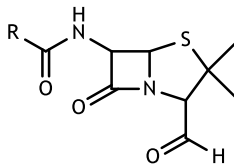
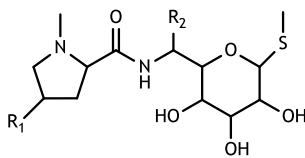
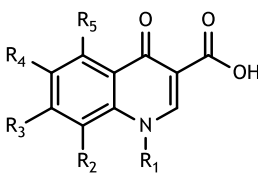
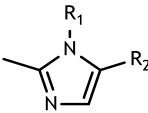
Analisando a Figura 1 é perceptível que o uso dos antibióticos é minimamente recente (primórdios de 1800), mas teve uma expressão muito significativa nos séculos XIX e XX. Vários passos foram dados na síntese de novas substâncias, mas o desenvolvimento de compostos cada vez mais eficazes prolonga-se pela atualidade.

### 2.1.2 Classificação e caracterização físico-química

A distribuição dos antibióticos no solo depende das suas propriedades físico-químicas. Diferentes tipos destes compostos aparecem no solo, alguns são hidrofóbicos ou não-polares, enquanto outros são completamente solúveis em água e dissociáveis a valores de pH típicos nos solos. Desta forma, muitos antibióticos têm tendência para se ionizar dependendo do pH do meio. Uma análise criteriosa dos  $pK_a$  associados aos diferentes grupos funcionais dos antibióticos torna mais perceptível este comportamento (Thiele-Bruhn 2003). Aliás, através de parâmetros como  $pK_a$ ,  $\log K_{ow}$ ,  $K_{oc}$  e  $K_d$ , pode-se compreender melhor a distribuição deste tipo de compostos no ambiente. Contudo esta previsão não será precisa, dado a enormidade de fatores que podem contribuir para a difusão ambiental (Gothwal and Shashidhar 2015).

A Tabela 1 apresenta os valores de  $\log K_{ow}$ ,  $pK_a$  e massa molar das principais classes de antibióticos, bem como a estrutura química destes compostos (Chu and Fernandes 1989; Tillotson 1996; Khosla *et al.* 1999; Brooks *et al.* 2001; Thiele-Bruhn 2003; Spízek *et al.* 2004; Falagas and Kasiakou 2005; Picó and Andreu 2007; Moreira 2010; Gómez-Caro *et al.* 2011; Homem and Santos 2011; Rahim *et al.* 2011; Papp-Wallace *et al.* 2011; Reeves 2011; WHOCC 2013; Bbosa *et al.* 2014).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das principais classes de antibióticos

Classes	Massa molar (g/mol)	log K <sub>ow</sub>	pK <sub>a</sub>	Estrutura
Tetraciclinas	444,5-527,6	-1,3 - 0,05	3,3/7,7/9,3	 <p>As tetraciclinas são representadas por núcleos lineares de carboxamidas naftacenos fundidos, podendo conter 4, 6 anéis.</p>
Sulfonamidas	172,2 - 300,3	-0,1 - 1,7	2 - 3/ 4,5 - 10,6	 <p>As sulfonamidas possuem um grupo funcional sulfonil ligado a um grupo amina.</p>
Aminoglicosídeos	332,4 - 615,6	-8,1 - -0,8	6,9 - 8,5	Os aminoglicosídeos consistem em dois ou mais grupos de amino açúcares unidos a um anel central de hexose por uma ligação glicosídica.
B-lactâmicos	334,4 - 470,3	0,9 - 2,9	2,7	 <p>As penicilinas são compostas por uma anel de tiazolidina unido a 4 amidas cíclicas, um anel B-lactâmico, um carboxilo livre e um ou mais grupos amino.</p>
Macrolídeos	687,9 - 916,1	0,45 - 15	7,7 - 8,9	 <p>Os macrolídeos são caracterizados por uma longa cadeia lactona macrocíclica, composta geralmente por 12, 14 ou 16 membros, ligados a um ou mais açúcares.</p>
Quinolonas	331,35	0,28	6,09 - 8,6	 <p>As quinolonas são caracterizadas por um núcleo quinolino substituído nas posições 1, 5, 6, 7 e 8.</p> <p>As fluoroquinolonas possuem um C6 fluorino ligado ao anel (substitui R4).</p>
Imidazóis	171,5 - 315,3	-0,02 - 3,9	2,4	 <p>Os imidazóis possuem um imidazólico livre unido a outros anéis aromáticos por ligações C-N.</p>
Polipeptídeos	499,6 - 1038	-1,0 - 3,2		Os polipeptídios possuem uma estrutura polipeptídica, em geral, de natureza cíclica.
Poliéteres	670,9 - 751,0	5,4 - 8,5	6,4	Os poliéteres caracterizam-se pela presença de uma estrutura polietérica.
Glicopeptídeos	1450,7		5,0	São compostos por um glicosilado cíclico ou por um peptídeo policíclico. Consistem em associações de açúcares e aminoácidos.
Derivados de Quinoxalina	263,3	-2,2	10	As quinoxalinas possuem um anel de benzeno ligado a um anel de pirazina.

### 2.1.3 Consumo

Atualmente, com o crescente aumento da população e, por consequência, com a maior proliferação de doenças, o consumo de antibióticos é cada vez mais elevado em todo o mundo. Mas este consumo não é constante, pois, na maioria dos países, o consumo de antibióticos varia significativamente com a estação do ano. Isto é, países mais longe do equador geralmente apresentam padrões sazonais mais relevantes em matéria de consumo de antibióticos (Van Boeckel *et al.* 2014).

Estima-se que entre os anos de 2000 e 2010, o consumo mundial de antibióticos aumentou cerca de 36%, de 54 083 964 813 unidades para 73 620 748 816 unidades. É de destacar que países como o Brasil, a Rússia, a Índia, a China e a África do Sul foram responsáveis por 76% desse aumento (Van Boeckel *et al.* 2014). À escala global o consumo anual de antibióticos ronda as 100 000 a 200 000 toneladas (Kümmerer 2003). Contudo, em regiões específicas como a China e os EUA, que são particularmente grandes consumidores de antibióticos, a libertação de grandes quantidades de antibióticos no ambiente é elevada, alimentando, assim, o ciclo de biotransformação e bioacumulação destes compostos no meio ambiente (Manzetti and Ghisi 2014).

Importa então comparar o consumo nestes países com outros grandes consumidores europeus. A Figura 2 compara o consumo de antibióticos nos EUA, China, Índia, e três grandes consumidores europeus, França, Alemanha e Reino Unido. É de realçar que o consumo de carbapenemos (45%) e polimixinas (13%) é o que mais tem aumentado (Van Boeckel *et al.* 2014), como se pode analisar pela barra mais escura (correspondente ao ano de 2010) destes dois compostos, em todos os países. Para o caso da Índia, a barra correspondente ao consumo de carbapenemos é totalmente azul escura e a barra correspondente às polimixinas é totalmente alaranjada, indicativo de que o consumo destas classes de antibióticos aumentou de nulo, ou muito reduzido, no ano de 2000, para valores consideráveis no ano de 2010.

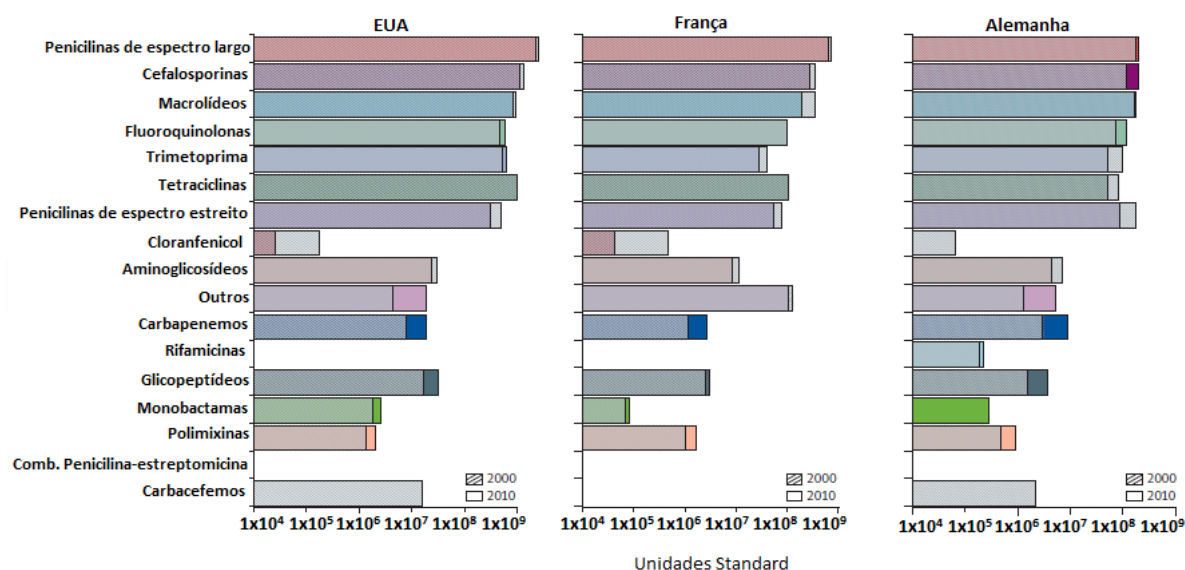


Figura 2 - Consumo de antibióticos por classe entre 2000 e 2010 (Van Boeckel *et al.* 2014)

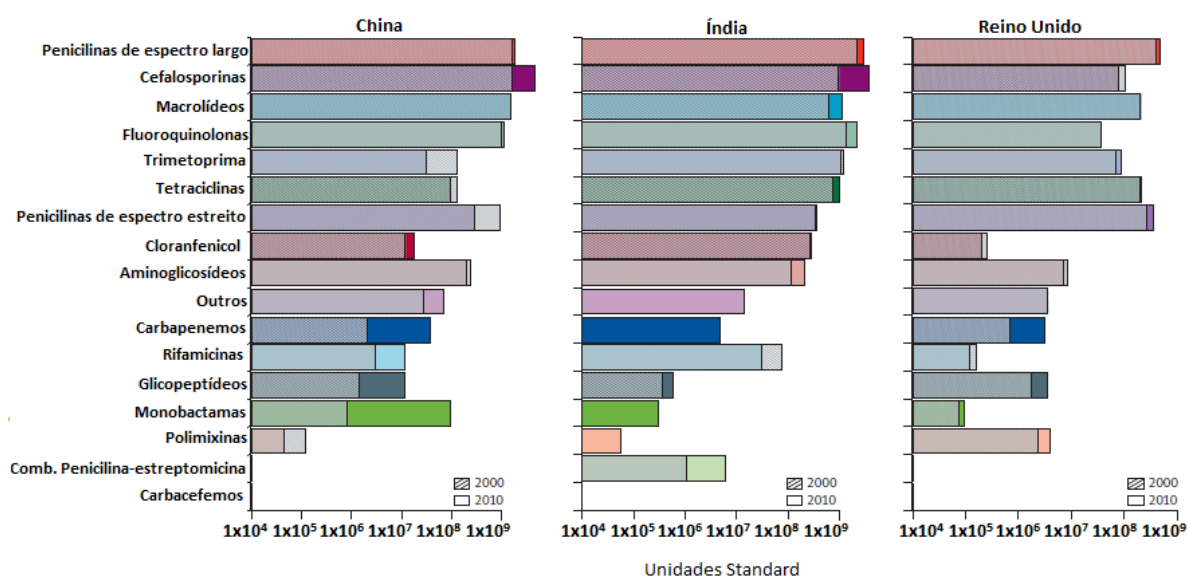


Figura 2 - Consumo de antibióticos por classe entre 2000 e 2010 (Van Boeckel *et al.* 2014) (continuação)

Em termos europeus, segundo a ECDC (2016) os maiores consumidores são a Hungria, a Eslováquia, a Alemanha e a Bulgária, como se encontra sistematizado na Figura 3. Portugal é assim o 16º país com maiores níveis de consumo de antibióticos a nível europeu.

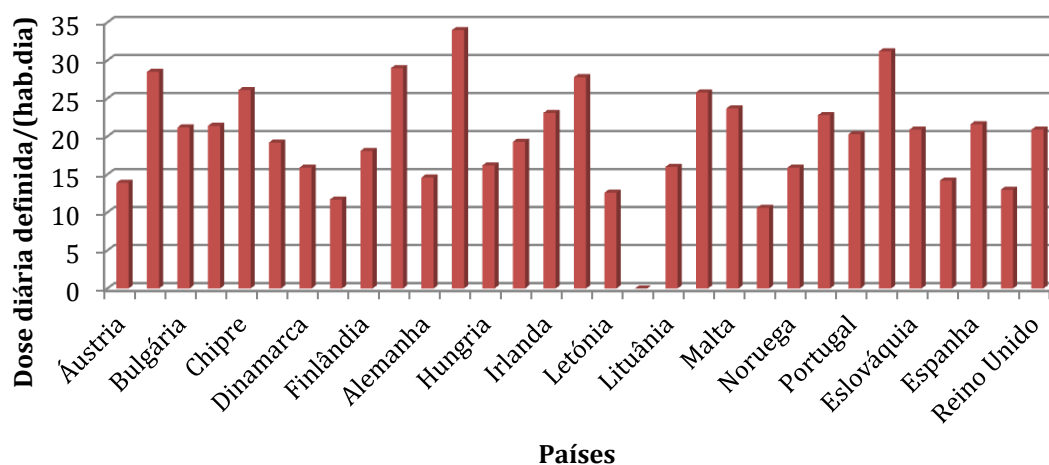


Figura 3 - Consumo de antibióticos em medicina humana nos países europeus no ano de 2014 (ECDC 2016)

A medicina veterinária e a medicina humana são as duas principais áreas de utilização e consumo de antibióticos.

Na medicina humana os  $\beta$ -lactâmicos, os macrolídeos e as tetraciclina são os mais utilizados (Schwabe 2001; Thiele-Bruhn 2003). Ao passo que na medicina veterinária as principais classes de antibióticos administrados são as tetraciclina, as sulfonamidas e os aminoglicosídeos (Thiele-Bruhn 2003; Seo *et al.* 2007). A Figura 4 apresenta a informação comparativa entre o consumo de antibióticos em medicina veterinária e em medicina humana para um país médio num ano médio.

Segundo a FEDESA, *European Federation of Animal Health*, existe uma relação de 2:1 entre antibióticos utilizados para consumo humano e medicina veterinária na Europa, e assim sendo, a quantidade de antibióticos libertados no ambiente da UE corresponde a aproximadamente 15 000 toneladas por ano, sendo que para os EUA os níveis são consideravelmente mais elevados, em particular para novos antibióticos (Bjerrum 2004; Patrick *et al.* 2004). Como exemplo, no ano de 2000 foram produzidas cerca de 16 200 toneladas de antibióticos, 70% dos quais foram utilizados para agricultura e pecuária e 30% para medicina humana (Kümmerer 2003).

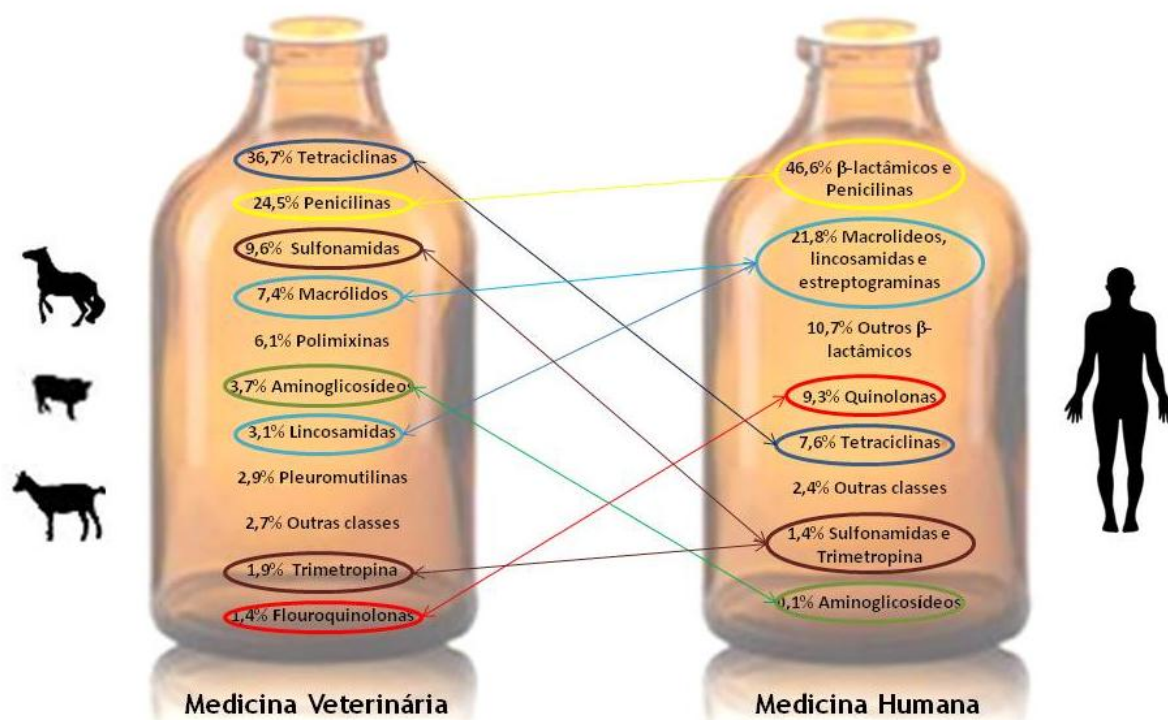


Figura 4 - Consumo de antibióticos por ano, em média, num país europeu para medicina humana e para medicina veterinária (dados 2010 e 2012) (European Medicines Agency 2013; ECDC 2014; CDDEP 2015; ECDC 2016)

## 2.1.4 Antibióticos no meio ambiente

### 2.1.4.1 Fontes de poluição

A ocorrência natural dos antibióticos nos solos deve-se à biossíntese dos microrganismos que vivem nos habitats existentes no solo ou nos sedimentos do mesmo (Gothwal and Shashidhar 2015). Contudo, estes compostos podem ser introduzidos no solo por outras vias, sendo que as maiores fontes de poluição de antibióticos no solo são as lamas de depuração e os estrumes (Li *et al.* 2013).

Kim *et al.* (2010) estimaram as concentrações de antibióticos em estrumes animais provenientes da Coreia e concluíram que a concentração de macrolídeos nesses estrumes era de 0,07-0,14 mg/kg para o caso de estrume de bovino, 1,05-2,1 mg/kg para o caso de estrume de suíno e 0,62-1,24 mg/kg para o caso de estrume de aves. Ao passo que para as sulfonamidas foram observados, para os mesmos tipos de estrumes, concentrações na ordem das 0,49, 8,44 e 1,39 mg/kg e para as tetraciclina concentrações na ordem das 1,65, 16,56, e 15,62 mg/kg, respetivamente. Já Akimenko (2015) e



Hamscher (2005) relataram a descoberta nos solos resíduos de antibióticos com concentrações à volta dos 300 ng/g para as tetraciclínas e até 11 ng/g para as sulfonamidas.

É, no entanto, de destacar que os seis produtos farmacêuticos mais comuns encontrados no solo são: os antibióticos (trimetoprima, sulfadiazina e triclosan), os analgésicos (ibuprofeno e diclofenac) e o anti-epiléptico (carbamazepina) (Li 2014).

Mas as lamas de depuração e os estrumes não são as únicas fontes importantes do aparecimento de antibióticos nos solos, sendo de realçar, também, a utilização dos mesmos em culturas de peixes, as inundações provocadas por águas superficiais, as descargas de resíduos sólidos industriais e o uso direto como pesticidas em vegetais, frutas e plantas ornamentais (Kim *et al.* 2010). A Figura 5 representa as principais fontes de introdução de antibióticos nos solos.

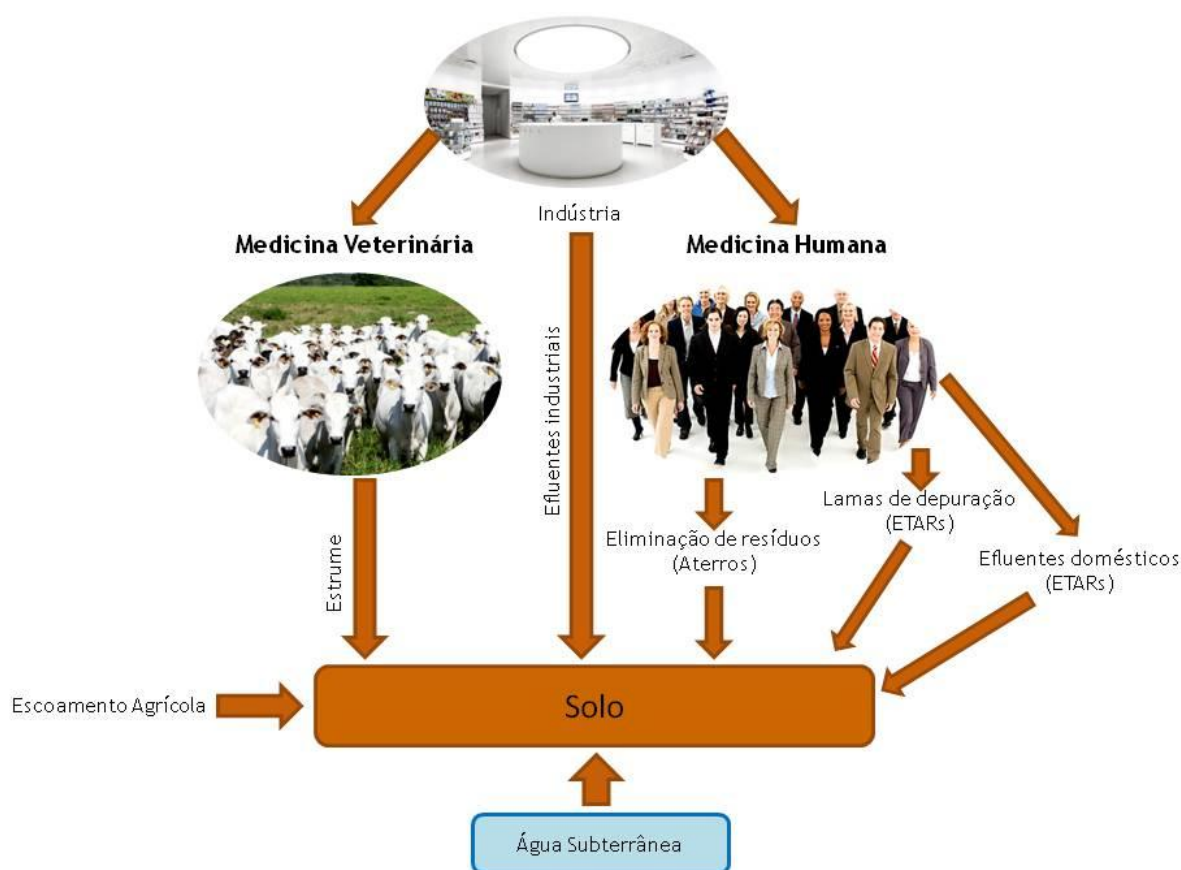


Figura 5 - Fontes de contaminação de antibióticos no solo (baseado em Szewzyk and Feuerpfeil 2000)

#### 2.1.4.2 Dinâmica de distribuição ambiental

Para entender a distribuição dos antibióticos nos solos é preciso analisar as diferentes classes estruturais dos mesmos, as quais variam consideravelmente no que diz respeito à estrutura molecular e às propriedades físico-químicas (Thiele-Bruhn 2003). Propriedades tais como a estrutura molecular, o tamanho, a forma, a hidrofobicidade, a solubilidade e a sorção condicionam a fixação dos antibióticos nos solos (Kemper 2008).

Assim, alguns antibióticos parecem persistir um longo período de tempo no ambiente, especialmente no solo, enquanto outros se degradam muito rápido. Uma vez no ambiente, a adsorção depende das propriedades físico-químicas do antibiótico mas também das condições climáticas prevalentes, do tipo de solo e de uma variedade de outros fatores ambientais (Kemper 2008).

Alas, devido à sua fixação no solo os antibióticos são compostos considerados poluentes emergentes (compostos químicos sintéticos ou naturais) que com a constante acumulação se podem vir a tornar em poluentes persistentes ou "pseudo-persistentes". Isto acontece porque a taxa de entrada dos mesmos no ambiente é maior do que a sua taxa de eliminação (Gothwal and Shashidhar 2015).

Mas é sobretudo a química dos antibióticos que mais afeta a sua distribuição no ambiente. Por isso, é preciso analisar com profundidade as características químicas deste grupo de compostos. Sendo estruturalmente diversos, compreendem compostos principalmente polares ionizáveis (Thiele-Bruhn 2003). Estes compostos após entrarem no ambiente são transportados por advecção e processos de dispersão. Durante o transporte, os antibióticos podem ficar adsorvidos à matéria em suspensão, podem acumular-se em sedimentos ou podem ficar retidos na parte aquosa (Díaz-Cruz *et al.* 2003). Esta tendência pode ser transmitida pelos coeficientes de partição e pelas reações de sorção e dessorção (Jechalke *et al.* 2014).

A sorção e a dessorção controlam não só a mobilidade e aceitação dos antibióticos por parte das plantas, mas também a biotransformação destes compostos e os possíveis efeitos biológicos (Jechalke *et al.* 2014). Para a maioria dos antibióticos, a sorção e a fixação não são apenas função da polaridade e da solubilidade na água, sendo maioritariamente controladas pelas propriedades dos numerosos compostos que dependem do pH do meio para a sua ionização, bem como do efeito deste fator na especiação química dos compostos (Russell L. Yeager 1990; Thiele-Bruhn 2003; Jechalke *et al.* 2014). Contudo, a sorção pode ser afetada pela excessiva fertilização do solo que introduz antibióticos no meio, causando sérios problemas (Jechalke *et al.* 2014).

Além das interações hidrofóbicas, os antibióticos podem ficar sorvidos nos solos através de ligações de hidrogénio, forças de Van Der Waals, de permuta catiónica, pontes de catiões e complexos de superfície (MacKay and Canterbury 2005; Lertpaitoonpan *et al.* 2009). Contudo, a fotodegradação, a biodegradação e a oxidação parecem ser os processos mais significativas na eliminação dos antibióticos do solo (Knapp *et al.* 2005).

Assim, estimar os coeficientes de sorção é de relevada importância para compreender o destino dos compostos no solo bem como o potencial de exposição a diferentes produtos químicos no ambiente e, consequentemente, ajudar na avaliação dos riscos ambientais (Sabljić *et al.* 1996). Antibióticos com pequena afinidade para adsorção têm mais tendência para ficarem retidos na parte líquida do que no solo (Díaz-Cruz *et al.* 2003).

Um dos principais coeficientes de partição no solo é o  $K_{ow}$ , coeficiente de partição octanol-água, o qual se altera consideravelmente em torno de um pH à volta da constante de dissociação do ácido (Vaes *et al.* 2000). Os valores dos coeficientes de partição para substâncias orgânicas, particularmente para o sistema octanol-água, adquiriram uma grande importância nos últimos anos, por razões de

caráter técnico e científico (Molyneux 2014). O valor deste coeficiente afeta a adsorção, a fotodegradação, assim como, a biodegradação dos antibióticos (Gothwal and Shashidhar 2015).

Na literatura são apresentadas muitas previsões em relação ao equilíbrio hidrofóbico/lipofílico e o caráter hidrofílico, sendo realizada uma estimativa dos coeficientes de partição dos mais complexos compostos, particularmente antibióticos e outros compostos farmacêuticos de importância (Molyneux 2014). Em particular, o  $K_{ow}$  é amplamente utilizado na previsão e interpretação das atividades biológicas dos compostos, particularmente nas indústrias farmacêuticas e de atividades clínicas, onde a fase de octanol é vista como um modelo parcial de hidrofobicidade das regiões no local ativo ou no recetor de sistema biológico. Assim sendo, compostos com  $K_{ow} > 1$  ( $\log K_{ow} > 0$ ) são considerados compostos lipofílicos, de acordo com a Tabela 2 (1) (Molyneux 2014).

Contudo, dois outros coeficientes também são normalmente utilizados para avaliar a distribuição dos compostos entre o solo e a água, sendo eles o  $K_d$ , coeficiente de distribuição, e o  $K_{oc}$ , coeficiente de partição carbono orgânico-água, que se relacionam consoante o demonstrado na Tabela 2 (2) (Teddy 2014). O  $K_d$  engloba dois mecanismos de sorção: a absorção e a adsorção, sendo descrito como demonstrado na Tabela 2 (3) (Teddy 2014). O  $K_{oc}$  é apenas uma estimativa do comportamento de sorção independentemente da permuta iônica, ligações por pontes de hidrogénio e polaridade dos grupos funcionais, encontrando-se representado na Tabela 2 (4) (Teddy 2014).

**Tabela 2 - Diferentes coeficientes de partição e dispersão relevantes no estudo de antibióticos em solos**

$K_{ow} = \frac{C_o}{C_w}$ (Teddy 2014)	$K_{oc} = K_d * \frac{100}{\%C_{org}}$ (Regitano 2010)	$K_d = \frac{C_s}{C_w}$ (Teddy 2014)	$K_{oc} = \frac{C_{oc}}{C_w}$ (Teddy 2014)
(1)	(2)	(3)	(4)

$C_o$  - concentração do composto na fase octanol ( $\mu\text{g/L}$ );  $C_w$  - concentração do composto na fase aquosa ( $\mu\text{g/L}$ );  $C_s$  - concentração do composto na fase sólida ( $\mu\text{g/kg}$ );  $C_{oc}$  - concentração do composto no carbono orgânico ( $\mu\text{g/kg}_{oc}$ )

Pelo acima descrito, facilmente se compreende que o solo é um ambiente bem mais complexo do que o ambiente aquático, isto porque os efeitos tóxicos dos contaminantes podem ser atenuados pela capacidade de tamponamento do solo. A juntar a isso a acumulação desses mesmos contaminantes torna-se fácil, uma vez que ocorre pouca mobilidade no solo, originando exposições prolongadas o que pode causar um aumento de efeitos tóxicos dos antibióticos (Knapp *et al.* 2005).

Prevê-se, então, que a melhor solução para reduzir as fontes de antibióticos no meio ambiente seja a diminuição do seu consumo (Gothwal and Shashidhar 2015)

#### 2.1.4.3 Legislação

Atualmente, apenas alguns estados membros da UE têm legislação específica para a proteção do solo. Isto porque, na UE o solo não está sujeito a um conjunto completo e coerente de regras. Apesar de existirem políticas para áreas como a agricultura, água, resíduos, produtos químicos e prevenção da poluição industrial, que contribuem indiretamente para a proteção dos solos, continua sem existir informação específica para o solo em si. Mas o âmbito de ação destas políticas é distinto, logo não são

suficientes para assegurar um nível adequado de proteção para todos os solos na Europa, tornando-se imperial a implementação de legislação específica (European Commission 2015).

Ou seja, os limites de concentração de antibióticos no meio ambiente não estão regulados, embora a preocupação tenha vindo a crescer, dado o risco ambiental associado aos medicamentos de uso veterinário nos EUA e na Europa (Thiele-Bruhn 2003; Kemper 2008). Para colmatar esta falha uma forma de avaliar os riscos causados pelos antibióticos utilizada atualmente baseia-se nos quocientes de risco (Gothwal and Shashidhar 2015). A avaliação de risco tem como objetivo a determinação dos níveis de contaminação, a fim de se determinar se são aceitáveis e não apresentam nenhum risco significativo para a saúde humana (Vulliet and Cren-Olivé 2011). No entanto, não há atualmente nenhum guia específico para avaliar o risco de contaminação pela presença de compostos farmacêuticos (Vulliet and Cren-Olivé 2011).

Desta forma, a concentração espacial média de resíduos de antibióticos no solo foi sugerida como o mais importante indicador de risco ambiental de uma região para resíduos de antibióticos (Xie *et al.* 2012).

Para o caso particular dos EUA, a avaliação de risco dos antibióticos usados em medicina veterinária é descrita através das EU diretivas 81/852/EEC e 92/18/EEC (Thiele-Bruhn 2003), mas em Portugal ainda não existe avaliação deste tipo.

#### **2.1.5 Resistência**

Hoje em dia reconhece-se que o uso abusivo ou indevido de antibióticos, incluindo práticas humanas e veterinárias, leva ao aparecimento de microrganismos resistentes, nomeadamente bactérias (Meyer *et al.* 2013).

A contaminação ambiental por antibióticos pode ter profundos efeitos ecológicos a vários níveis. Contudo, o aumento de antibióticos no solo e a sua cada vez maior proliferação origina um crescente aumento de resistência por parte de bactérias patogénicas, que é de longe a questão mais importante. Isto acontece porque expondo o solo a uma contaminação, como é o caso dos antibióticos, de uma forma repetitiva, este torna-se num ambiente propício ao desenvolvimento de microrganismos resistentes. Estes microrganismos tornam-se resistentes porque devido à estimulação da atividade microbiana se desenvolvem genes capazes de resistir a estes mesmos compostos, designando-se como genes resistentes a antibióticos (ARG) (Mojica and Aga 2011). Estes genes são transferidos para outros seres vivos originando uma redundância funcional e diminuindo a eficácia dos antibióticos para o fim que foram produzidos (Jechalke *et al.* 2014).

Aliás, a resistência aos antibióticos é atualmente considerada como um dos principais desafios de saúde enfrentados no séc. XXI, sendo que cabe OMS atuar a fim de combater este problema. Assim, a OMS tem como estratégia atuar sobre as cinco áreas mais importantes no que diz respeito ao controlo da resistência aos antibióticos, sendo elas: a vigilância, o uso racional em seres humanos, o uso racional em animais, a prevenção e o controlo da infeção e a inovação (Meyer *et al.* 2013).

Recentemente foi descoberto que existem cerca de 30000 genes codificados para apresentarem resistência a vários antibióticos, sendo de realçar os  $\beta$ -lactâmicos, a vancomicina e a tetraciclina

(D'Costa *et al.* 2011). Isto acontece porque o solo é um dos maiores e mais diversificados habitats microbianos na terra, onde se encontram muitas *Streptomyces*, cujas espécies são responsáveis pela maioria dos antibióticos produzidos naturalmente (Forsberg *et al.* 2012). Assim sendo, o solo é atualmente reconhecido como um vasto repositório de genes resistentes a antibióticos (*resistom*) evidenciados pelo recente intercâmbio entre as bactérias do solo e os produtos farmacêuticos (Forsberg *et al.* 2012).



## 2.2 Métodos Analíticos

De um modo geral, a escolha do método analítico baseia-se em várias características, sendo de destacar: as propriedades físico-químicas e a concentração do analito, a matriz da amostra, a rapidez e o custo da análise, o tipo de medições, quantitativamente e qualitativamente, e o número de amostras (Lindholm 2004).

Existem diversos métodos analíticos, contudo o funcionamento geral de cada um deles é muito semelhante, podem ser esquematizado da seguinte forma: amostragem; preparação da amostra; extração e concentração da amostra; separação dos analitos de interesse e detecção do composto de interesse (Lindholm 2004).

Após recolher a amostra é comum realizar-se a preparação da mesma com o intuito de remover interferentes que poderiam pôr em causa a qualidade dos resultados. Depois de removidos os interferentes recorre-se a um método pré-determinado, consoante as características dos compostos a estudar, para extrair os mesmos da matriz que os contém (por exemplo, *SPE*, *solid phase extraction*, ou *LLE*, *liquid-liquid extraction*). Extraídos os compostos é necessário separá-los por intermédio de um método analítico apropriado (por exemplo, *LC*, *liquid chromatography*, ou *GS*, *gas chromatography*). Por fim, sendo necessário visualizar e quantificar esses compostos recorre-se a um método de detecção (por exemplo, *DAD*, *diode array detector*, ou *MS*, *mass spectrometry*) (Lindholm 2004).

Desta forma, serão abordados seguidamente os diferentes métodos que se podem utilizar, nomeadamente, as técnicas de extração, os métodos analíticos e os detetores utilizados.

### 2.2.1 Métodos de extração

Os métodos de extração são utilizados para remover compostos sólidos ou líquidos de uma amostra utilizando um solvente orgânico (Lewis 2007). Existem vários métodos de extração utilizados para separar duas fases distintas, sendo de distinguir os que ocorrem em fase sólida, como o *SPE*, dos que ocorrem em fase líquida, como o *LLE*. Como neste estudo vão ser analisadas amostras de solo, o enfoque será sobre os métodos de extração em fase sólida.

O *SPE*, extração em fase sólida, é um método de extração que recorre a uma fase sólida e a uma fase líquida para isolar um tipo de analito específico a partir de uma solução (Waters 2016a). É normalmente utilizado para “limpar” uma amostra antes de utilizar um método de análise cromatográfico ou outro, utilizado para quantificar os analitos em estudo na amostra (Biziuk 2006).

Os procedimentos de extração em fase sólida são utilizados não só para extrair vestígios de compostos orgânicos a partir de amostras ambientais, mas também para remover os interferentes em matrizes complexas de modo a obter um extrato líquido contendo os analitos de interesse. A técnica *SPE* é amplamente aplicado para o isolamento de analitos a partir de uma matriz líquida e extratos purificados (Biziuk 2006). Em termos de procedimento o *SPE* é muito semelhante ao procedimento de extração líquido-líquido (*LLE*), envolvendo uma repartição do soluto entre duas fases. No entanto, em vez de duas fases líquidas não miscíveis, como ocorre no *LLE*, o *SPE* envolve a partição entre um líquido (matriz de amostra ou solvente com analitos) e uma fase sólida (sorvente) (Biziuk 2006). Permite desta

forma a concentração e purificação das substâncias a analisar, garantindo melhores resultados. O procedimento geral passa assim por acumular uma solução na fase sólida, lavar os componentes indesejados, e, em seguida, lavar os analitos desejados com um outro solvente para um tubo de recolha (Skoog *et al.* 2005). Este procedimento é altamente eficiente no que diz respeito à recuperação e ao consumo de solvente. Para além disso, o *SPE* produz maiores recuperações dos analitos do que os restantes métodos equivalentes, além de garantir uma remoção completa das interferências (Ferrone *et al.* 2016).

O *SPE* reparte-se, assim, por cinco fases de tratamento principais, como se encontra ilustrado na Figura 6: pré-tratamento da amostra; condicionamento do cartucho; carregamento da amostra, lavagem do cartucho e eluição das frações.

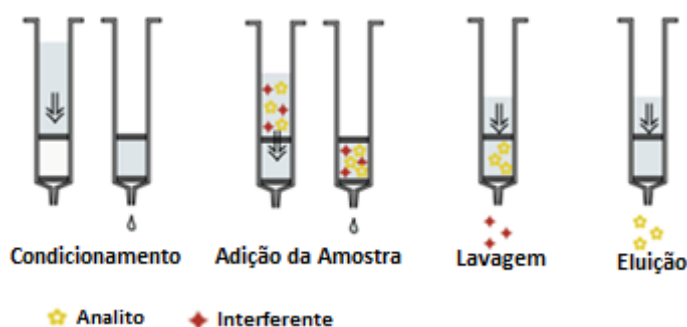


Figura 6 - Método SPE: opção de retenção dos analitos (Macherey-Nagel 2012)

No que diz respeito a antibióticos a maior dificuldade prende-se com a escolha do melhor adsorvente a utilizar em técnicas *SPE* para se obter uma recuperação aceitável para todos analitos, caracterizados por diferentes propriedades físico-químicas (Ferrone *et al.* 2016).

Uma variante do *SPE* é a extração em fase sólida dispersiva, *DSPE*. Trata-se de uma técnica com um custo simplificado, elevada rapidez e baixa componente técnica, a qual tem sido eficazmente aplicada como *clean-up* de extratos de amostras biológicas (Fontana *et al.* 2011). Esta técnica é recorrente na preparação de amostras simples e de forma direta, adequando-se a uma ampla variedade de produtos alimentares e agrícolas (Waters 2016b).

Um método específico de *DSPE* que se tornou popular designa-se por técnica *QuEChERS* e foi criado para facilitar a avaliação rápida de grande número de amostras (Waters 2016b). *QuEChERS* (pronuncia-se “catchers”) trata-se de um método de extração baseado em ‘trabalho feito’ (*work done*) e foi descoberto e publicado por Anastassiades *et al.* (2003). Este método tem como vantagens ser rápido, fácil, económico, efetivo, robusto e seguro, permitindo explorar as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (Prestes *et al.* 2009). Durante o seu desenvolvimento uma grande ênfase foi dada à obtenção de um procedimento dinâmico, o qual pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas como se encontrada representado na Figura 7.

A escolha do solvente de extração tem em conta diversos fatores sendo de destacar: a capacidade de abranger o espectro de análise desejado (compostos polares/não-polares); a seletividade que deve ser atingida durante a extração (extração/partição dos compostos de interesse e/ou limpeza



da amostra); permitir uma clara separação da fase sólida/fase aquosa; ser analisável por técnicas cromatográficas (como *LC*, *MS*, entre outras) e o custo, a segurança e as preocupações ambientais com o solvente em causa, bem como o tratamento do mesmo (Anastassiades *et al* 2003). O acetonitrilo é o solvente de extração mais utilizado devido à capacidade que tem de se separar da água quando realizada uma mistura adequada de sais ( $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$ ) (Vera *et al.* 2013). Contudo, quando o acetonitrilo não se apresenta como solvente de extração viável, outras soluções como metanol, acetona ou acetato de etilo podem ser utilizadas como solvente de extração (Lehotay 2011). Um outro aspeto a ter em conta na escolha do solvente de extração é o seu pH, uma vez que os  $\text{pK}_a$  dos compostos podem revelar ou não uma afinidade para o solvente em causa, logo este passo deve ser criteriosamente analisado (Vera *et al.* 2013). Segundo Bragança *et al.* (2012) o ajuste do pH, neste caso para o acetonitrilo, leva a melhores resultados do que a acidificação da água. Salvia *et al.* (2012) também estudaram diversos solventes para extrair antibióticos, sendo que as melhores recuperações foram obtidas para o acetonitrilo e acetonitrilo acidificado com ácido acético. O volume típico de solvente a utilizar é de 10 mililitros, sendo que este pode variar entre 4 e 30 mililitros segundo os estudos já realizados (Vera *et al.* 2013), tal como demonstrado na Figura 7.

Após a fase de adição do solvente segue-se a fase de adição de sais ( $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$ ), o *QuEChERS I*, para induzir a fase de extração (Anastassiades *et al* 2003). O  $\text{NaCl}$  permite aumentar a recuperação dos compostos polares e controlar a percentagem de água na fase orgânica. Associando-o ao  $\text{MgSO}_4$ , o qual tem a capacidade de se ligar a grandes quantidades de água, permite a redução significativa da fase aquosa, o que provoca a partição dos analitos na camada orgânica (Vera *et al.* 2013). É de notar que a quantidade de sulfato de magnésio adicionado deve ser bem superior à sua capacidade de saturação em água (7 moles de  $\text{MgSO}_4$  para 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Anastassiades *et al* 2003; Lehotay 2011). No *QuEChERS II*, fase de limpeza da amostra, ocorre a adição combinada de  $\text{MgSO}_4$ , PSA e C18. O PSA, adicionado em pequena quantidade, é uma estrutura que tem um elevado efeito quelante devido à presença da amina secundária, bem como da amina primária, que permite eliminar os ácidos gordos e outros compostos polares da amostra (Anastassiades *et al* 2003; Prestes *et al.* 2009), o C18 funciona como adsorvente em fase inversa, permitindo remover os açúcares e o amido (Caldas *et al.* 2011), ao passo que o  $\text{MgSO}_4$  permite remover a água residual (Anastassiades *et al* 2003).

Contudo, este procedimento apesar de mais eficiente e rápido do que os conhecidos métodos de extração apresenta uma desvantagem considerável que reside na formação de aglomerados de sal que podem comprometer a extração (UCT 2011). Por este motivo é necessário que logo após a adição de cada *QuEChERS* ocorra imediatamente uma agitação em vórtex, para que não se formem aglomerados de sulfato de magnésio e se consigam obter altas percentagens de recuperação. Alguns autores defendem ainda que se deve proceder a uma etapa de ultrassons para garantir que nenhuma condicionante desse tipo afete o procedimento extrativo (Bragança *et al.* 2012; Vera *et al.* 2013).

Existe ainda uma etapa de centrifugação para separar a fase sólida da fase líquida, sendo que a fase líquida é recolhida para análise por método analítico (Correia-Sá *et al.* 2012), a qual deverá conter os compostos de interesse (que aderem à fase líquida após extração dos mesmos), como é descrito na Figura 7.

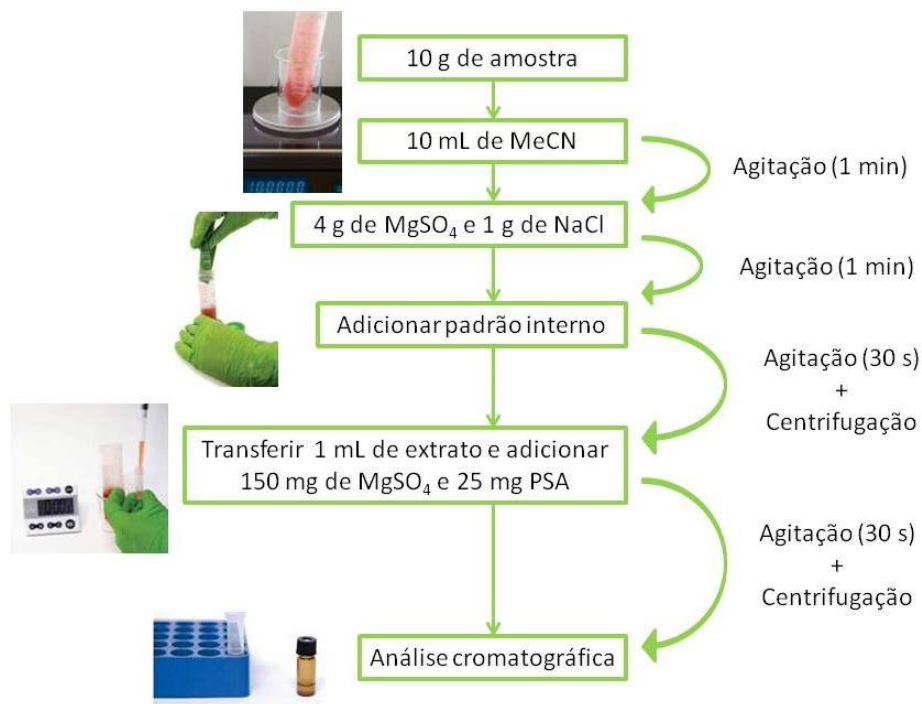


Figura 7 - Etapas de aplicação para o método *QuEChERS* (adaptado de *Prestes et al. 2009*)

## 2.2.2 Métodos instrumentais

### 2.2.2.1 Método de separação

Hoje em dia, a cromatografia líquida é o tipo de cromatografia mais utilizado para análise de amostras ambientais. Uma das opções, cada vez mais utilizadas é a cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC*), a qual recorre a colunas preenchidas com partículas de pequenos diâmetros que permitem a separação dos componentes da amostra (*Petrovic et al. 2010*). A separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (a amostra) e duas fases, sendo que uma se designa por estacionária e outra por móvel. A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica, isto é, um cilindro rígido (normalmente de aço ou vidro) no interior do qual se encontra um material de enchimento formado por pequenas partículas. A fase móvel ou solvente flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injetada pela coluna e pelo detetor. As substâncias presentes na amostra, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, dispõem de distintos graus de «afinidade» com as fases móvel e estacionária e por conseguinte as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Pode-se então concluir que a substância com maior «afinidade» com a coluna é aquela que elui por último e, por oposição, a substância que elui em primeiro lugar será a de menor «afinidade» com o enchimento (fase estacionária) (*Chust 1990*).

De uma forma simplificada, um sistema *HPLC* é composto pela seguinte forma: reservatório que contém a fase móvel; bomba de alta pressão (sistema de distribuição de solvente); injetor (introduz a amostra no fluxo de fase móvel que flui continuamente na coluna de *HPLC*); coluna (fase estacionária); detetor (dos compostos separados) e tubagem de alta pressão e acessórios (utilizados para interligar os

diversos componentes mencionados) (Waters 2016c). A Figura 8 representa o esquema do funcionamento de um HPLC típico.

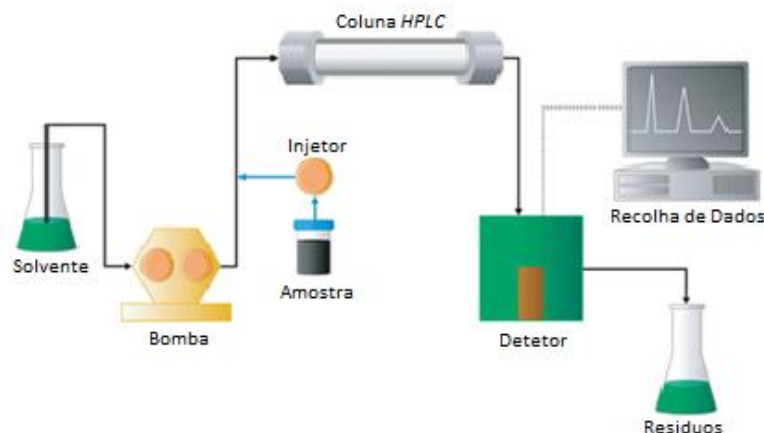


Figura 8 - Sistema representativo do funcionamento em HPLC (baseado em Waters 2016c)

#### 2.2.2.2 Método de detecção

É necessário ter em conta que a maioria das amostras contém componentes incolores que requerem algum tipo de detetor para os localizar nas frações recolhidas, não sendo detetáveis a “olho nu” (Waters 2016a). A detecção é feita com recurso a detetores que se encontram ligados à estação de recolha de dados (computador), o qual regista o sinal elétrico necessário para gerar um cromatograma (resposta em função do tempo). Assim torna-se possível identificar e quantificar a concentração dos constituintes da amostra (Waters 2016c).

As características dos compostos na amostra podem ser muito diferentes, tendo sido, por esse motivo, desenvolvidos vários tipos de detetores. Em cromatografia líquida os detetores mais utilizados variam entre ultravioleta (UV), fluorescentes, eletroquímicos, refrativos (RI) e de espectrometria de massa (MS) (Lindholm 2004). Uma outra alternativa passa pela associação em série de dois ou mais detetores dos acima referidos ou similares (Waters 2016c).

Os dois tipos de detetores mais utilizados são o *DAD* e o *MS* (Lindholm 2004), sendo por este motivo abordados de seguida.

A grande vantagem do *DAD* prende-se com a capacidade de escolher o melhor comprimento de onda para a análise dos compostos em questão, permitindo uma rápida disponibilidade de informação (Lindholm 2004). Algumas características podem variar num *DAD*, incluindo a resolução, a gama de comprimentos de onda, o *NIR* (*Near InfRed*), a estabilidade da linha de base, a integração do pico e o tipo de células (Biocompare 2016). Contudo, este detetor não apresenta erros mecânicos nem oscilações com o tempo aquando das medições (Lindholm 2004), em oposição aos detetores UV. A Figura 9 apresenta um esquema simplificado da diferença de operação entre um detetor para um único comprimento de onda e um detetor para vários comprimentos de ondas, exemplificando como é efetuada a leitura.

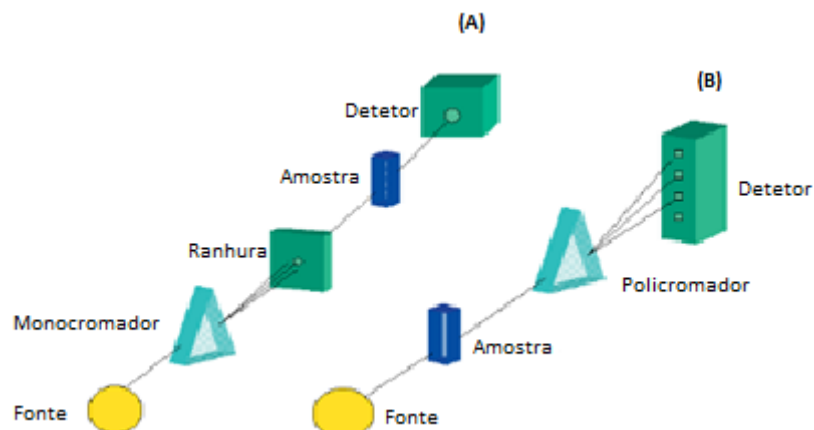


Figura 9 - Detetor de um único comprimento de onda convencional (A) e detetor de múltiplos comprimentos de onda (B) (baseada em Lindholm 2004)

Ao contrário dos detectores de um único comprimento de onda que são normalmente utilizados para análises quantitativas, o *DAD* pode ser utilizado quer para análises quantitativas quer para análises qualitativas das amostras (Lindholm 2004). Este detetor é frequentemente utilizado no controlo da produção de antibióticos onde é necessário que ocorra uma rápida triagem e identificação dos compostos desconhecidos (Lindholm 2004).

Por oposição, a deteção por *MS* é a técnica mais usualmente utilizada quando se pretende obter informação quantitativa e qualitativa de um componente numa mistura (Lindholm 2004). O detetor *MS* compreende três partes principais: a interface, onde os iões são gerados, o separador, onde se separam os iões de acordo com o rácio massa-carga, e o detetor (Lindholm 2004), como demonstrado na Figura 10.

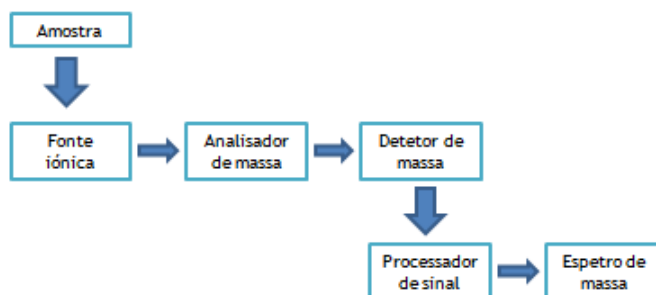


Figura 10 - Esquema do funcionamento de um detetor *MS* (baseado em Koppenaal et al 2005)

A combinação de cromatografia líquida (*LC*) e espectrometria de massa (*MS/MS*) tornou-se na técnica mais popular e eficaz para analisar compostos de baixo peso molecular em fluidos biológicos, especialmente em estudos químicos e clínico-farmacêuticos (Caglar *et al.* 2015). Isto acontece porque os métodos analíticos para multi-resíduos são eficazes no rastreamento de baixas concentrações de compostos. Estes métodos permitem a determinação de um grande número de micropoluentes numa única análise, o que reduz significativamente o tempo e o custo do processo (Petrovic *et al.* 2010). A técnica *LC-MS* é, por estes motivos, mais apropriada quando se opera com um grande número de compostos (Niessen 1998).

Do ponto de vista ideal, os métodos analíticos para multi-resíduos utilizados na determinação de poluentes orgânicos vestigiais em matrizes ambientais devem cumprir vários critérios, tais como (Petrovic *et al.* 2010): a preparação da amostra e a pré-concentração da mesma ser realizada num único passo, embora os diferentes analitos possuam diferentes propriedades físico-químicas; os limites *LOD* e *LOQ* serem suficientemente baixos para cada analito; permitir a detecção específica da substância em estudo; ser de fácil aplicação a várias matrizes (p.e. água naturais, águas de consumo e águas residuais).

É de realçar que ao longo dos últimos 20 anos, a espectrometria de massa associada à cromatografia líquida (*LC-MS*) tem avançado significativamente no que diz respeito à sua sensibilidade, especificidade e confiabilidade (Petrovic *et al.* 2010).



## 3 Casos de Estudo

A ocorrência de antibióticos no solo tem origem em duas fontes principais: a medicina humana e a medicina veterinária. Os antibióticos como a ciprofloxacina (fluoroquinolona), a eritromicina (macrolídeo), a amoxicilina (B-lactâmico), o cloranfenicol, a sulfametoxazol (sulfonamida), a doxiciclina (tetraciclina) e o metronidazol (nitroimidazol) são usadas quer em medicina humana, quer em medicina veterinária e aparecem frequentemente nos solos e em águas residuais (Lin *et al.* 2004; Qiang and Adams 2004; Homem *et al.* 2010; Taylor *et al.* 2010; AGISAR 2011; Michigan State University 2011; Aquino 2013; Hopkins and Blaney 2013; Batchu *et al.* 2014; DrugFuture 2016; Guo *et al.* 2016). Contudo, antibióticos como a tilosina (macrolídeo) e a tilmicosina (macrolídeo) são utilizados exclusivamente em medicina veterinária, aparecendo sobretudo em solos onde se colocam estrumes animais (AGISAR 2011; Guo *et al.* 2016). Em Portugal, a doxiciclina e amoxicilina são mesmo os antibióticos com maior consumo (DGAV 2011).

Para simplificar a atividade laboratorial foram selecionados dois antibióticos com expressão em ambas as vertentes e que existiam em quantidade no laboratório: a sulfametoxazol e o metronidazol. Estes antibióticos aparecem nos solos e importa perceber como é possível efetuar a sua extração, de forma a extrapolar a metodologia para os restantes compostos. Segundo a DGAV (2011) e a DGV (2010), as sulfonamidas, classe de que faz parte a sulfametoxazol, são a sexta classe de antibióticos mais vendida em Portugal (6,72%), ao passo que os imidazóis, juntamente com outras classes de menor relevo, representam a quinta porção de antibióticos mais vendidos em Portugal (8,22%).

A seguir encontram-se descritas as principais propriedades destes dois antibióticos a ter em conta no estudo da sua distribuição no solo.

### 3.1 Metronidazol

O Metronidazol trata-se de um nitroimidazol anti-infecioso que é muito eficaz no tratamento de infeções intestinais e intrabdominais (Çalışkan and Göktürk 2010; Lo *et al.* 2010). Foi classificado pela *WHO Essential Medicines List* como *anti-emético, anti-giardíase e antibacteriano* (Taylor *et al.* 2010). A sua primeira abordagem foi efetuada em 1962 por Shinn, que estudou o seu efeito na gestão de infeções anaeróbicas (Shinn 1962). Trata-se de um composto bem estudado atualmente, sendo raramente tóxico no sistema nervoso central (Lee 2016), contudo tóxico em pequenas quantidades para as plantas (Jjemba 2002).

Na Tabela 3 estão enunciadas as principais características físico-químicas do metronidazol e na Figura 11 a sua estrutura química, diagrama de especiação e respetivos  $pK_a$ . O equilíbrio de ionização do metronidazol encontra-se representado na Figura 12.

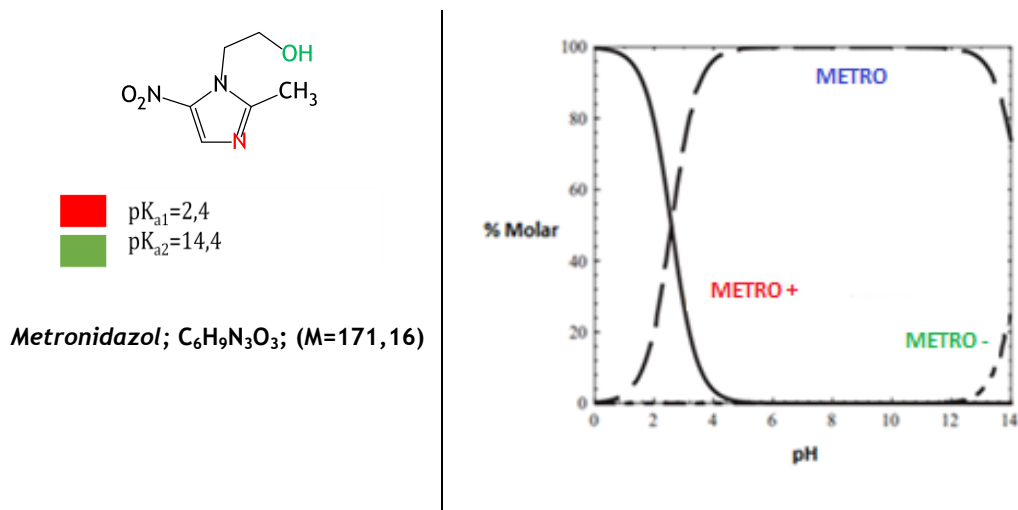


Figura 11 - Estrutura química, diagrama de especiação e respectivos  $pK_a$  do metronidazol (Carrales-Alvarado *et al.* 2014)

Tabela 3 - Propriedades do Metronidazol (Kumar *et al.* 2005; Siddappa *et al.* 2008; Taylor *et al.* 2010; Pereira *et al.* 2012; Calabrese *et al.* 2013; Carrales-Alvarado *et al.* 2014; Teddy 2014)

Propriedades Metronidazol					
Solubilidade em água (mg/L)	$pK_a$	$\log K_{ow}$	$K_{oc}$ (L/g)	$K_d$ (L/g)	$\lambda_{m\acute{a}x}$
9500	$pK_{a1} = 2,4$ $pK_{a2} = 14,4$	-0,02	39-56	0,54 - 0,67	277 nm

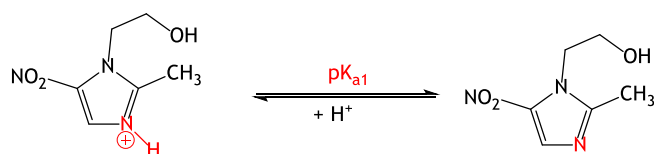


Figura 12 - Equilíbrio de ionização do metronidazol

### 3.2 Sulfametoxazol

A sulfametoxazol trata-se de uma sulfonamida bacteriostática que é vulgarmente utilizada para tratar infeções do trato urinário (Çalışkan and Göktürk 2010). É um antibiótico persistente usado quer em medicina veterinária quer em medicina humana (Morel *et al.* 2014), tendo sido utilizado ativamente no combate ao *Staphylococcus Aureus* (Paul *et al.* 2015) e na prevenção de doenças infecciosas (Wang *et al.* 2012). Em termos do aparecimento de sulfametoxazol nos solos, a maioria dos estudos referentes à sorção de sulfonamidas em matrizes, tais como o solo, relata uma forte dependência do pH (Thomas and Wouter 2006; Kurwadkar *et al.* 2007). Segundo Hamscher *et al.* (2004) as máximas concentrações de sulfametoxazol nos solos rondam os 0,02 mg/kg, sendo que para o caso geral das sulfonamidas e, segundo He and Zhang (2014), a concentração em solos, devida à colocação de diversos estrumes, encontra-se na gama 0,01 - 29 mg/kg.



Na Tabela 4 estão enunciadas as principais características físico-químicas da sulfametoxazol, nomeadamente os  $pK_a$  e as constantes de distribuição em matrizes sólidas (como o solo) e líquidas (como a água) ( $K_{ow}$ ,  $K_{oc}$  e  $K_d$ ) e na Figura 13 a sua estrutura química, diagrama de especiação e respetivos  $pK_a$ . É de notar que o aumento da sorção a baixo pH origina a neutralização da carga negativa da molécula da Sulfametoxazol (Morel *et al.* 2014). Por análise da Tabela 4 e da Figura 13 entende-se este composto é um fraco sorbato e que a sorção pode aumentar ou diminuir na presença de cátions complexantes presentes no solo (Morel *et al.* 2014). O equilíbrio de ionização da sulfametoxazol encontra-se representado na Figura 14.

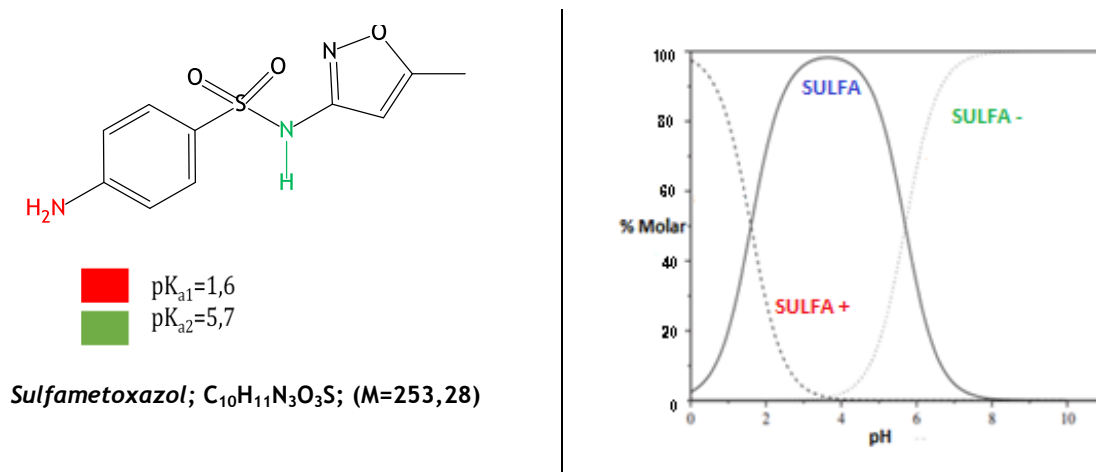


Figura 13 - Estrutura química e diagrama de especiação da Sulfametoxazol (Teixeira *et al.* 2012; Qi *et al.* 2014)

Tabela 4 - Propriedades Sulfametoxazol (Kim *et al.* 2009; Tamtam *et al.* 2011; Pereira *et al.* 2012; Aquino 2013; Qi *et al.* 2014; Teddy 2014; Tonucci *et al.* 2015)

Propriedades Sulfametoxazol					
Solubilidade em água (mg/L)	$pK_a$	$\log K_{ow}$	$K_{oc}$ (L/g)	$K_d$ (L/g)	$\lambda_{m\acute{a}x}$
610	$pK_{a1} = 1,6$ $pK_{a2} = 5,7$	0,89	56-530	0,23 - 38	264 nm

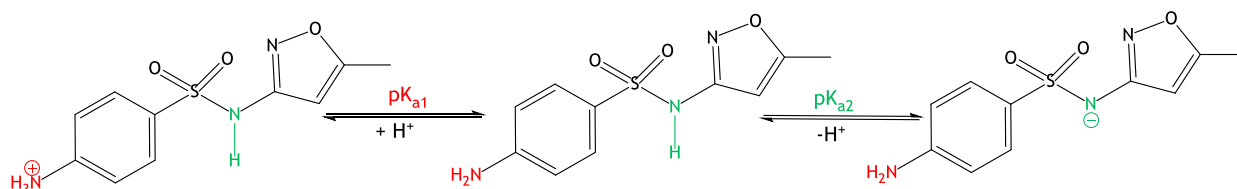


Figura 14 - Equilíbrio de ionização da Sulfametoxazol

As características aqui referidas serão utilizadas ao longo do trabalho para compreender o comportamento dos referidos antibióticos e interpretar os resultados nos métodos de extração utilizados.



## 4 Estado da Arte

Neste capítulo são apresentados diversos estudos realizados em diferentes países relativamente ao aparecimento de antibióticos nos solos e lamas de depuração, com o intuito de os comentar e discutir. Na Tabela 5 estão representados os estudos das análises simultâneas das várias classes de antibióticos, bem como os métodos analíticos e extrativos utilizados em cada caso e as respetivas concentrações obtidas.

Os antibióticos utilizados em medicina humana e veterinária são compostos considerados persistentes ou pseudo-persistentes que aderem ao solo implicando graves contaminações ambientais (Gothwal and Shashidhar 2015). Para analisar estes compostos são precisos métodos de análise e de extração apropriados, que devem ser analisados ao pormenor para evitar o agravamento da situação. As estratégias mais utilizadas e que permitem uma maior taxa de sucesso implicam inicialmente um pré-tratamento recorrendo a soluções com EDTA a fim de evitar que os antibióticos, que se pretendem remover, complexem com iões livres no solo e impossibilitem a sua remoção (Andreu *et al.* 2009). Após o pré-tratamento dá-se início ao método de extração, sendo o mais utilizado o *SPE* (Babić *et al.* 1998), recorrendo, para tal, a adsorventes como *C18*, *ENV+* e *HLB* (Kim and Carlson 2007). De seguida procede-se a uma análise analítica por *HPLC* ou equivalente método de cromatografia líquida, a qual é precedida por um detetor apropriado. Os detetores mais utilizados são os *MS* ou *UV* (por exemplo, *DAD*) e detetores fluorescentes (Huang *et al.* 2013; Bash 2015; Dasgupta and Sengupta 2015).

Vários estudos têm sido efetuados ao longo dos anos para monitorizar as concentrações de várias classes de antibióticos nos solos e nos estrumes aplicados nos mesmos. Assim sendo, de seguida serão apresentados exemplos desses estudos cujos autores se encontram inerentemente citados.

Sollicec *et al.* (2016) estudaram o fracionamento dos antibióticos em solos agrícolas e águas de drenagem com o intuito de analisar a distribuição e o trajeto destes compostos nos referidos meios, muito devido à alteração dos mesmos por adição de estrumes. Para tal efetuaram a extração das amostras recorrendo ao método *SPE*, sendo que procederam inicialmente a um pré-tratamento das amostras com um complexante (EDTA) e um corretor de pH (ácido cítrico). Posto isto, iniciou-se a etapa de extração propriamente dita recorrendo a um polímero de fase inversa *Strata-X* que funcionou como adsorvente. Este foi condicionado com uma solução de metanol, padrão McIlvaine e água, tendo sido posteriormente lavado com uma solução combinada de água e metanol, na proporção de volumes 90:10, e eluída com uma solução de metanol contendo 0,1% de *HCOOH*. Findada a extração deu-se início à etapa analítica recorrendo a cromatografia líquida (*LC*), na qual se utilizou como fase estacionária uma coluna Hypersil GOLD™C18 e como fases móveis água contendo 0,1% de *HCOOH* e metanol com a mesma percentagem de *HCOOH*. A deteção foi feita recorrendo a um detetor *HESI-MS/MS*. Para as percentagens de recuperação obtiveram-se valores entre os 40 e os 111%.

Meersche *et al.* (2015) desenvolveram um método de *UHPLC - MS/MS* para deteção e quantificação de cinco classes de diferentes antibióticos veterinários em dejetos de suínos, de forma simultânea, para tal foi efetuado um pré-tratamento com *MeCN* e *TCA*, afastando-se claramente do tipo de tratamento efetuado pelos autores atrás referidos. Para a etapa de extração foi utilizado um

método extrativo simples recorrendo a acetonitrilo e ácido tricloroacético. Este método é bem mais simples que o *SPE*, muito provavelmente porque neste caso em si o que se pretendia aprofundar era o método analítico, tendo-se recorrido a *UHPLC* acoplado de um detetor *MS/MS*. Na etapa de cromatografia líquida recorreu-se a uma Coluna Kinetex  $C_{18}$  como fase estacionária e como fases móveis utilizou-se uma composta por  $H_2O$  combinado com MeCN na proporção de volumes 95:5, ácido fórmico e formato de amónio e outra composta por MeCN e ácido fórmico. Obteve-se para este estudo percentagens de recuperação na ordem dos 94 % a 118%, o que revela esta alternativa como viável, uma vez que o procedimento mais simples permite obter altas percentagens de recuperação, implicando menos custos de processo em comparação com os outros estudos, como o anteriormente citado.

Tang *et al.* (2015) testaram os efeitos da aplicação de estrume em solos de cultivo de arroz na ocorrência de antibióticos e genes de resistência a antibióticos em 4 amostras de solo de diferentes locais da China: Jiaxing, Changsha, Yingtan e Nanchang. Estas amostras de solo continham duas classes de antibióticos principais, isto é, tetraciclinas e sulfonamidas, as quais foram extraídas recorrendo ao método *SPE*. Mas antes de se efetuar a extração foi efetuado um pré-tratamento às quatro amostras de solo, a fim de minimizar interferências e garantir a correta remoção dos compostos de interesse. Este pré-tratamento consistiu na adição de  $Na_2EDTA$ , a fim de evitar a complexação dos compostos de interesse (que se pretendem remover) com os iões do solo, e assim garantir a eficiência da extração. Além disso, procedeu-se a um ajuste de pH, recorrendo a um tampão de citrato, com o intuito de garantir as condições de segurança na posterior leitura em aparelho de cromatografia líquida. Este pré-tratamento foi, no entanto, muito semelhante ao efetuado por Sollicec *et al.* (2016) com diferenças no adsorvente utilizado e na fase de condicionamento. Quando as amostras já se encontravam devidamente tratadas procedeu-se então à extração dos antibióticos utilizando como adsorvente um cartucho *HLB*, que foi condicionado recorrendo a uma solução de metanol e água pura, sendo posteriormente lavado com água ultrapura e eluído com uma solução de metanol e ácido fórmico. Após realizada a extração efetuou-se a análise da amostra por cromatografia líquida (*LC*) utilizando como fase estacionária uma coluna Zorbax XDB  $C_{18}$  e recorrendo a duas fases móveis, uma composta por ácido fórmico aquoso e outra composta por acetonitrilo. Por fim, para se detetar os compostos de interesse utilizou-se um detetor *MS/MS-ESI*. As percentagens de recuperação obtidas oscilaram entre os 58,6% e os 91,2%, ligeiramente inferiores às obtidas por Sollicec *et al.* (2016).

Dorival-García *et al.* (2015) testaram um tratamento melhorado para a determinação de 17 quinolonas fortemente sorbidas no solo recorrendo a um método de extração, *d-SPE*, e de análise, *UHPLC*, diferente dos três autores interiores. O pré-tratamento realizado antes da extração da amostra também foi muito mais simplificado resumindo-se à aplicação de um padrão de metanol e de acetonitrilo:ácido fórmico na proporção de volumes de 7:3. O método de deteção utilizado foi o *MS-ESI*. Em termos de recuperação os valores variaram entre os 95,3% e os 106,2%, não apresentando diferenças significativas para Sollicec *et al.* (2016), Meersche *et al.* (2015) e Tang *et al.* (2015), apesar da opção por métodos de extração e análise mais sofisticados.

Cerqueira *et al.* (2014) estudaram a adequabilidade do método *QuEChERS* para a extração de compostos farmacêuticos de lamas. Utilizaram como solvente de extração acetonitrilo acidificado com

ácido acético, adicionando no *QuEChERS I*  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$  e no *QuEChERS II*  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{PSA}$  a 2 mL de extrato. As percentagens de recuperação foram muito variáveis entre os 50% e os 95%, comparativamente mais baixas às percentagens obtidas para compostos do mesmo tipo recorrendo a outras técnicas de extração como *SPE*.

Awad *et al.* (2014) monitorizaram a ocorrência e as variações sazonais de antibióticos na água, nos sedimentos e no solo perto de uma instalação de compostagem de dejetos suínos na Coreia recorrendo ao tradicional método de extração, *SPE*. Antes desta etapa foi efetuado um pré-tratamento com tampão McIlvaine combinado com hidróxido de amónio e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ . Posto isto deu-se início ao método de extração propriamente dito, recorrendo a um adsorvente Oasis *HLB*, o qual foi condicionado com metanol e água desionizada, sendo seguidamente lavado com água e eluído com metanol. Findada esta etapa procedeu-se à análise cromatográfica por *HPLC*, utilizando como fase estacionária uma coluna XTerra MS  $\text{C}_{18}$  e como fases móveis uma composta por água e ácido fórmico, outra composta por acetonitrilo e ácido fórmico e outra composta por metanol puro. Por fim, para detetar os componentes na amostra recorreu-se a um detetor *MS/MS*. As recuperações variaram entre 40% e 114%, o que se trata de uma gama demasiado alargada e traduz pouca fidelidade dos resultados.

Y. Bin Ho *et al.* (2014) analisaram a ocorrência de antibióticos veterinários e progesterona em estrume e em solo agrícola na Malásia recorrendo à extração por *SPE*. Contudo, antes de se efetuar a extração propriamente dita, foi necessário efetuar um pré-tratamento com a adição de acetonitrilo, um padrão interno e um tampão de extração composto por metanol:acetonitrilo:EDTA:tampão McIlvaine na proporção de volumes 30:20:25:25. Para além disso ainda se efetuou um ajuste de pH com ácido fosfórico. Findada esta etapa procedeu-se então à extração propriamente dita utilizando Oasis *HLB* como adsorvente, o qual foi condicionado com metanol e água ultrapura, sendo posteriormente lavado com água ultrapura e eluído com metanol. Consequentemente deu-se início à etapa de cromatografia líquida (*LC*) a fim de detetar os compostos na amostra, tendo-se por isso recorrido a uma coluna XTerra  $\text{MSC}_{18}$  como fase estacionária e a duas fases móveis, uma composta por ácido fórmico combinado com formato de amónio em água ultrapura e outra composta por acetonitrilo:metanol na proporção de volumes de 1:1. Procedeu-se depois à deteção recorrendo a um detetor *MS/MS*. As recuperações obtidas rondaram os 72% e os 121%, como no estudo realizado pelo mesmo autor em 2012 (abaixo descrito), reflexo da semelhança de tratamento efetuado.

Y. Huang *et al.* (2013) procuraram fazer a extração simultânea de quatro classes de antibióticos diferentes no solo, lamas e estrume. A etapa de extração foi precedida de um pré-tratamento recorrendo a um padrão interno e a um padrão de substituição, seguida da adição de EDTA-SPB acetonitrilo: $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  na proporção de volumes de 3:1. Posto isto, deu-se início ao *SPE* recorrendo ao comum adsorvente Oasis *HLB* que foi condicionado e lavado com metanol e água ultrapura, sendo seguidamente eluído com metanol contendo 0,1% de ácido fórmico. Este procedimento foi muito semelhante aos restantes estudos, com pequenas modificações. Na etapa analítica recorreu-se à cromatografia líquida (*LC*) para a qual se utilizou uma coluna Kromasil  $\text{C}_{18}$  como fase estacionária e água contendo ácido fórmico e metanol como fases móveis. Em termos de recuperação, os valores variaram entre os 52,8% e os 137,5% dependendo dos antibióticos em causa, o

que traduz uma gama de valores muito alargada e pouco convincente em termos de aprovação do método utilizado.

Y. B. Ho *et al.* (2012) determinaram antibióticos veterinários e hormonas de galinha no estrume e no solo. Inicialmente foi efetuado um pré-tratamento recorrendo a um padrão interno, um tampão de fosfato, acetonitrilo e um tampão de extração composto por metanol:acetonitrilo:EDTA:tampão McIlvaine na proporção de volumes 30:20:25:25. Após efetuada esta etapa realizou-se a extração por SPE, Oasis HLB foi selecionado como adsorvente, que foi condicionado com metanol e água ultrapura, seguido de lavagem com água ultrapura e, por fim, eluído com metanol. Terminada esta etapa deu-se início a análise por cromatografia líquida (LC) utilizando como fase estacionária uma coluna Xterra MSC<sub>18</sub> e como fases móveis ácido fórmico combinado com formato de amónio em água ultrapura e acetonitrilo combinado com metanol na percentagem de volumes de 1:1. Como método de deteção recorreu-se ao MS/MS. Obtiveram-se valores de recuperações na ordem de 72% a 121%. Este procedimento é muito semelhante ao realizado por Sollicec *et al.* (2016) e Tang *et al.* (2015), contudo as pequenas alterações introduzidas permitiram obter percentagens de recuperação mais elevadas, o que indica que a metodologia é provavelmente mais eficiente do que as anteriores.

Bragança *et al.* (2012) recorreram ao método QuEChERS para extrair o ibuprofeno e os seus metabolitos do solo. Nesta experiência foram variadas diversas condições em cada um dos ensaios efetuados, tais como, a massa de solo (10; 7,5; 5 g), o solvente de extração (Acetonitrilo, Acetonitrilo-Metanol em diferentes proporções de volumes, Metanol, n-Hexano-acetona, Etil acetato e Acetona), o tempo de agitação (1, 2, 3, 4, 5, e 10 minutos) e o conteúdo de cada QuEChERS (MgSO<sub>4</sub> e CH<sub>3</sub>COONa; MgSO<sub>4</sub> e NaCl; MgSO<sub>4</sub>, NaCl, NaCit e Na<sub>2</sub>Cit; variando sempre as quantidades de cada componente, como demonstrado na Tabela 5). As recuperações obtidas variaram entre 79,5% e 101%, apresentando uma gama de variação baixa e, por isso, coerência nos resultados. Os bons resultados são fruto da otimização das condições de agitação e da utilização de novos solventes, provavelmente mais eficazes do que os convencionais. É o caso do ACN:MeOH, com o qual se obteve os melhores resultados de todas as experiências efetuadas por estes autores. Foram igualmente testadas condições distintas da composição de cada QuEChERS. Contudo, a comparação não pode ser feita num paralelismo total, dado que os compostos utilizados são diferentes dos anteriores. Contudo, os bons resultados transmitem a viabilidade do método em causa.

Comparando os vários estudos aqui abordados é de notar que existem métodos preferenciais para cada uma das três etapas - extração, análise e deteção. Na etapa de extração o método mais recorrente é o SPE, sendo que o adsorvente mais comum é o Oasis HLB, ao passo que na etapa de análise o mais recorrente é a cromatografia líquida (LC), sendo usual a utilização de uma coluna Xterra MS C<sub>18</sub> como fase estacionária, contudo outro tipo de colunas é comumente selecionado, por fim, para a etapa de deteção o mais recorrente é o detetor MS.

Uma nova abordagem ao problema passa pela adoção de novo método de extração - QuEChERS. Desta feita estudos mais recentes (2012 a 2014) apontam para a adoção deste método para a extração de antibióticos dos solos em detrimento de outras técnicas utilizadas. Segundo Anastassiades *et al* (2003) trata-se de uma técnica de extração mais rápida, simples e económica do que as anteriores. O

procedimento base de *QuEChERS* encontra-se descrito na Figura 7 e em todos os procedimentos existe uma etapa de agitação e de adição do *QuEChERS I* (remoção da água em excedentário -  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$ ) e do *QuEChERS II* (remoção da matéria orgânica -  $\text{PSA}$  e  $\text{C18}$  - e água residual -  $\text{MgSO}_4$ ) em alturas sequenciais (Vera *et al.* 2013). A utilização do método *QuEChERS* é muito recente no estudo da extração dos antibióticos nos solos. Como é de notar, pelas citações efetuadas acima, existem muito mais estudos de antibióticos nos solos que recorrem ao *SPE* para efetuar a sua extração do que a *QuEChERS*. O método *QuEChERS* foi inicialmente utilizado na análise de frutas e legumes, mas tem hoje em dia uma grande aplicabilidade numa vasta gama de produtos agrícolas (UCT 2011), contudo a aplicação em antibióticos é ainda uma estratégia recente, tendo sido ultimamente recorrente no estudo de pesticidas em solos (Lesueur *et al.* 2008; Caldas *et al.* 2011).

Para Robert Baudot (2014) que comparou as técnicas *PLE*, *QuEChERS*, *SPLE* e *dSPE*, *QuEChERS* é a técnica mais recomendável para a extração de antibióticos de amostras de solo. É uma técnica mais rápida, económica e fácil de implementar, no entanto ainda não se encontra bem estudada para este tipo de compostos, sendo por isso pouco implementada.

Para o estudo realizado, procurou-se comparar os dois principais métodos extrativos utilizados - *SPE* e *QuEChERS*, como a seguir descrito. O método de análise utilizado foi o mais recorrente para este tipo de amostras - *HPLC*. Já o detetor não foi o mais recorrente - *MS* - pois apesar de transmitir resultados mais concretos, permitindo identificar o composto com certeza, não está disponível no laboratório de trabalho, daí a opção por um detetor de arranjo de díodos (*DAD*).





Tabela 5 - Métodos para extração e análise de antibióticos em matrizes de solo

Local	Analitos	Concentração (µg/kg)	Pré-tratamento	Método de extração	Método de análise	Recuperação (%)	Parâmetros Analíticos (LOD e LOQ) (µg/kg)	Referências
Canadá	AMX; TMP; LCM; SFX; CFT; TYL; PEG; TC; 4-ETC; ATC; 4-EATC; 4-ECTC; DC; DEC; OTC; MC; CTC; SPI; 4-EDC; 4-ECTC; ICT; 4-EICT	TMP<LOQ-37 LCM<LOQ SFX<LOQ TC<LOQ-17 4-ETC<LOQ-16 ATC=ND-152 4-EATC=ND-1020 OTC<LOQ MC=ND DEC=ND ou <LOQ 4-EDC=ND-154 DC<LOQ-46 CTC<LOQ-333 4-ECTC=ND-145 ICT=ND-34 4-EICT=ND-66	2 g solo Tampão EDTA-McIlvaine adicionado Agitação em vórtex Ultrasonicação Centrifugação Filtração Acidificação (c/ ácido cítrico) EDTA adicionado (0,1 M) pH = 5	SPE Adsorvente: polímero de fase inversa Strata-X Condicionamento: MeOH, H <sub>2</sub> O e Tampão McIlvaine Lavagem: H <sub>2</sub> O:MeOH (90:10, v/v) Eluição: MeOH c/ 0,1% de HCOOH Evaporação dos eluatos c/ corrente de azoto Recuperação com H <sub>2</sub> O	LC-HESI-HRMS Fase estacionária: Hypersil GOLD™C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,9 µm) Fase móvel: H <sub>2</sub> O c/ 0,1% de HCOOH MeOH c/ 0,1% de HCOOH Fonte de ionização por electropulverização aquecida (4300 V; T capilar = 275 °C; T vaporizador = 300 °C) Espectrómetro de massa Q-Exactive	40 - 111%	r <sup>2</sup> = 0,961-0,999 LOD = 1,0 - 7,4 LOQ = 3,3 - 25	(Sollicet <i>et al.</i> 2016)
Bélgica	CTF; CLTA; CLTB; DC; OTC; SFZ; TMP; TYL A	CTF=ND CLTA=ND-48600 CLTB=ND-40800 DC=ND-22760 OTC=ND-2029 SFZ=ND-2980 TMP<LOQ-6 TYL A=ND-NQ	2 g solo (± 0,1 g de estrume)	Método extrativo simples Spike MeCN adicionado + TCA (6%) adicionado Homogeneização Agitação Centrifugação Evaporação Reconstituição Agitação em vórtex Ultrasonicação Filtração	UHPLC - MS/MS Fase estacionária: Coluna Kinetex C <sub>18</sub> (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) Fase móvel: H <sub>2</sub> O/MeCN (95/5) + Ácido Fórmico (0,5%) + Formato de Amónio (0,1%) MeCN + Ácido Fórmico (0,1%)	94 - 118%	LOD = 1,1 - 20,2 LOQ = 3,5 - 67,3	(Meersche <i>et al.</i> 2015)
China	CTC; OTC; TC; SMZ; SMX; SDZ	CTC=5-80x10 <sup>-3</sup> OTC,TC,SMZ,SMX,SDZ=1-16x10 <sup>-3</sup>	1 g solo; 0,5 g estrume Spike MeOH/Tampão de EDTA-McIlvaine adicionado (1:1, v/v) Agitação em vórtex	SPE Adsorvente: HLB (60 mg) Condicionamento: MeOH e H <sub>2</sub> O ultrapura Lavagem: H <sub>2</sub> O ultrapura	LC-MS/MS-ESI Fase estacionária: Zorbax XDB C18 (2,1 mm *150 mm, 3,5 µm) Fase móvel: Ácido fórmico	58,6% - 74,5%, para CTC, OTC e TC 73,0% - 91,2% para SMZ, SMX e	LOQ e LOD foram determinados	(Tang <i>et al.</i> 2015) (Luo <i>et al.</i> 2011)

			Ultrasonicação Centrifugação Trimetil- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> adicionado Na <sub>2</sub> EDTA adicionado Simatone (padrão interno) adicionado Filtração pH = 4 3x	Eluição: MeOH c/ ácido fórmico (0,1%, v/v) Concentração	aquoso 0,1% (V/V) ACN	SDZ			
Espanha	PIP; ENO; NO; CIP; OFL; ENR; DIF; MAR; DAN; SAR; CIN; LOM; MOX; NAL; OXO; FLU; PIR	MOX=ND-79,5 MAR=ND-13,9 OFL=10,7-719,2 ENR=9,0-674,4 CIP=152-836 NOR=ND-131 PIR=ND-6,1 CIN=ND-9,60 OXO=ND-18,4 FLU=ND-5,8 NAL=ND-23	1 g solo Agitação em vórtex <i>Spike</i> Agitação em vórtex pH=3	<b>SALLE - d-SPE</b> ACN: ácido m-fosfórico (1%, 7:3, v/v) adicionado <i>QuEChERS I</i> : 3 g NaCl Agitação Centrifugação <i>QuEChERS II</i> : 300 mg PSA+600 mg MgSO <sub>4</sub> Agitação Centrifugação Evaporação (corrente de N <sub>2</sub> ) Recuperação (formato de amônio: MeOH (1:1, v/v)) Centrifugação	<b>UHPLC</b> <b>LC-MS</b> <b>ESI</b> <b>Fase estacionária</b> : Coluna C <sub>18</sub> (2,1 mm x 100 mm, 1,7µm) <b>Fase móvel</b> : Formato de Amônio e MeOH Solução padrão adicionada (0,5 µg/mL)	95,3% - 106,2%	r <sup>2</sup> = 0,993-0,999 LOD = 0,2-0,5 LOQ = 0,5 a 1,5	(Dorival-García <i>et al.</i> 2015)	
Brasil	AMI; AZA; CBP; CTD; CTM; DLZ; FLP; GFZ; GBA; CTZ; LDC; MBZ; METRO; MIZ; NSL; PDS; PPL; SULFA; TEO; TMP	AMI=1-250 AZA=1-250 CBP=2-250 CTD=2-250 CTM=0,5-250 DLZ=0,5-250 FLP=0,5-250 GFZ=5-250 GBA=10-250 CTZ=2-250 LDC=0,5-250 MBZ=0,5-250 METRO=0,5-250 MIZ=2-250 NSL=0,5-250	10 g de lamas	<b>QuEChERS</b> Solvente ACN c/ CH <sub>3</sub> COOH adicionado Agitação Agitação em vórtex <i>QuEChERS I</i> : 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl Agitação Agitação em vórtex <i>QuEChERS II</i> : 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 125 mg PSA Agitação em vórtex Centrifugação Recolha sobrenadante Filtração	<b>UPLC-MS/MS</b> <b>ESI</b> Sistema UPLC <i>Acquity Ultra</i>	50 - 95%	r <sup>2</sup> = 0,98-0,99 LOD = 0,15 - 0,6 LOQ = 0,5 - 10	(Cerqueira <i>et al.</i> 2014)	

			PDS=5-250 PPL=1-250 SULFA=2-250 TEO=10-250 TMP=1-250						
Coreia	TC; CTC; OTC; SFM; SULFA; SFO	TC=20,83-177,64 CTC=0,07-0,85 OTC=0,09-0,71 SFM=ND-1,11 SULFA=0,50-1,10 SFO=0,04-0,38	1 g solo Peneiração Tampão McIlvaine/Hidróxido de amônio adicionado Na <sub>2</sub> EDTA (5 %) adicionado Agitação Centrifugação Filtração pH = 2,74	SPE Adsorvente: Oasis HLB (3 mL/60 mg) Condicionamento: MeOH + H <sub>2</sub> O desionizada Lavagem: H <sub>2</sub> O Eluição: MeOH	HPLC - MS/MS Fase estacionária: Coluna XTerra MS C <sub>18</sub> (2,1 mm × 50 mm, 2,5 µm) Fase móvel: H <sub>2</sub> O (99,9%) + Ácido fórmico (0,1%) ACN (99,9%) + Ácido fórmico (0,1%) (v/v) MeOH puro	62 - 111% para TC, CTC e OTC 40 - 114% para SFM, SULFA e SFO	LOQ = 0,6 - 2,3 R <sup>2</sup> > 0,99	(Kim and Carlson 2007; Ok <i>et al.</i> 2011; Awad <i>et al.</i> 2014)	
Malásia	DC; ERI; TYL; AMX; NOR; SFZ; TMP; ENR; FLU; TILMI	DC=63-728 ERI<LOQ TYL<LOQ-679 NOR<LOQ-96 SFZ<LOQ TMP<LOQ-60 ENR=36-378 FLU<LOQ-1331 TILMI<LOQ AMX=ND	1 g solo Peneiração (2 mm) Padrão interno (IS) adicionado Solvente de extração (MeOH:ACN:0,1 M EDTA:tampão de McIlvaine (pH 4), 30:20:25:25) adicionado Agitação em vórtex Ultrasonicação Centrifugação Recolha do sobrenadante Filtração pH = 2,3 (ajustado c/ H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Extracção de ultra-sons + SPE Adsorvente: Oasis HLB (3 cc/60 mg) Condicionamento: MeOH + H <sub>2</sub> O ultrapura Lavagem: H <sub>2</sub> O ultrapura Eluição: MeOH Secagem a vácuo Evaporação (c/ corrente de N <sub>2</sub> ) Ácido fórmico (0,1%) + MeOH (25%) em H <sub>2</sub> O ultrapura adicionado Filtração	LC-MS/MS Fase estacionária: Coluna Xterra MSC <sub>18</sub> (10,0 cm; 2,1 mm; 3,5 µm) Fase móvel: Ácido fórmico (0,3%) + Formato de amônio (0,1%) em H <sub>2</sub> O ultrapura ACN:MeOH (1:1)	72-121%	LOD = 0,5 - 3 LOQ = 2 - 10	(Ho <i>et al.</i> 2014) (Ho <i>et al.</i> 2012)	
China	TC; OTC; CTC; DC; TC-D6; DEC; SFZ; SULFA; SFM; SFM-4; SMM; SCX; SFDM; SFDm-D6; SFT; SCZ; SULFA-D4; NOR; OFL; CIP; ENR; CIP-D8; ENR-D5; RXT	TC; OTC; CTC; DC; TC-D6; DEC=ND-3262,5 SFZ; SULFA; SFM; SFM-4; SMM; SCX; SFDM; SFDm-D6; SFT; SCZ; SULFA-D4=ND-1040 NOR; OFL; CIP; ENR; CIP-D8; ENR-D5=ND-7000 RXT=ND-209,5	2 g de solo; 0,2 g lamas; 0,2 g estrume Padrão interno adicionado Solvente de extração EDTA-SPB ACN:Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . NH <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O, 3:1, v/v) adicionado Agitação em vórtex Ultrasonicação Centrifugação Recolha do sobrenadante Filtração	SPE Adsorvente: Oasis HLB (6 mL/500 mg) Condicionamento: MeOH Lavagem: H <sub>2</sub> O ultrapura Eluição: MeOH (c/ 0,1% de ácido fórmico)	LC - MS/MS ESI Fase estacionária: Coluna Kromasil C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm) Fase móvel: H <sub>2</sub> O (c/ 0,1% ácido fórmico) MeOH	69,3 - 132,7% para TC, OTC; CTC, DC, TC-D6, DEC 61,3 - 111% para SFZ, SULFA, SFM, SFM-4, SMM, SCX, SFDM, SFDm-D6, SFT, SCZ, SULFA-D4 52,8 - 94,5% para NOR, OFL,	LOD = 0,09 - 3,57 LOQ = 0,49 - 11,90 0,9983 < R <sup>2</sup> < 0,9997	(Huang <i>et al.</i> 2013)	

						CIP, ENR, CIP-D8, ENR-D5 66,5 - 137,5% para RXT			
Malásia	DC; ENR; ERI; FLU; NOR; SFZ; TILMI; TMP; TYL	DC=62,6-728,4 ENR=36,1-377,7 ERI<LOQ FLU<LOQ-1331,4 NOR<LOQ-95,7 SFZ<LOQ TILMI<LOQ TMP<LOQ-60,1 TYL<LOQ-678,9	1 g solo Peneiração (2 mm) Padrão interno adicionado Tampão de extracção (MeOH: ACN: 0,1 M de EDTA: tampão de McIlvaine (pH 4), 30: 20: 25: 25) adicionado Agitação em vortex Ultrasonicação Centrifugação Recolha do sobrenadante Filtração pH = 2,3 (c/ H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	SPE Adsorvente: Oasis HLB (3 cc/60 mg) Condicionamento: MeOH + H <sub>2</sub> O ultrapura Lavagem: H <sub>2</sub> O ultrapura Eluição: MeOH Secagem a vácuo Evaporação (c/ corrente de N <sub>2</sub> ) Filtração	LC-MS/MS Fase estacionária: Coluna Xterra MSC <sub>18</sub> (3,5 µm, 2,1 mm × 100 mm) Fase móvel: Ácido fórmico (0,3%) + Formato de amónio (0,1%) em H <sub>2</sub> O ultrapura ACN: MeOH (1:1) ESI (30 V; T capilar = 400 °C; T vaporizador = 150 °C)	72% - 121%	LOD = 0,5 - 3 LOQ = 2 - 10	(Ho <i>et al.</i> 2012)	
Portugal	IBP; HIBP; CIBP	CIBP=46,1x10 <sup>-3</sup> HIBP=ND IBP=ND	10; 7,5; 5 g de solo Spike Agitação em vórtex (1, 2, 3, 4, 5 e 10)	QuEChERS Solventes: Acetonitrilo; Acetonitrilo- MeOH (60:40; 50:50; 40:60, v/v); MeOH; n-hexano-acetona ; (50:50, v/v); Etil acetato; Acetona QuEChERS I: 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g CH <sub>3</sub> COONa QuEChERS II: 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl QuEChERS III: 6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g NaCl + 1,5 NaCit + 0,750 g Na <sub>2</sub> Cit QuEChERS IV: 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl + 1 NaCit + 0,50 g Na <sub>2</sub> Cit Ultrasonicação Centrifugação Recolha do sobrenadante Evaporação (corrente N <sub>2</sub> ) Recuperação em ACN Filtração	LC-FLD Fase estacionária: Coluna C <sub>18</sub> (4,60 mm × 150 mm, 5 µm) Fase móvel: ACN e H <sub>2</sub> O ultrapura	79,5% - 101%	r <sup>2</sup> = 0,999 LOQ = 6,10 - 22,4	(Bragança <i>et al.</i> 2012)	

**Legenda:** 4-epianidrotetraciclina (4-EATC); 4-epiclorotetraciclina (4-ECTC); 4-epidemeclociclina (4-EDC); 4-episcloretetraciclina (4-EICT); 4-epitetraciclina (4-ETC); Ácido Nalidixico (NAL); Ácido Oxolinico (OXO); Ácido Pipemídico (PIP); Ácido Piromídico (PIR); Amitriptilina (AMI); Amoxicilina (AMX); Anidrotetraciclina (ATC); Azatioprina (AZA); Benzilpenicilina (PEG); Carbamazepina (CBP); Carboxi-ibuprofeno (CIBP); Cefotiofur (CFT); Cetoconazol (CTZ); Cinoxacina (CIN); Ciprofloxacina (CIP); Claritromicina (CTM); Clortalidona (CTD); Clortetraciclina (CTC); Colistina A (CLTA); Colistina B (CLTB); Danofloxacina (DAN); Demeclociclina (DEC); Diclilanil (DCA); Difloxacina (DIF); Dilitazem (DLZ); Doxiciclina (DC); Enoxacina (ENO); Enrofloxacina (ENR); Eritromicina (ERI); Espiramicina (SPI); Florfenicol (FFC); Flumequina (FLU); Flurazepam (FLP); Gemfibrozil (GFZ); Glibenclamida (GBA); Hidroxi-ibuprofeno (HIBP); Ibuprofeno (IBP); Isoclorotetraciclina (ICT); Lidocaína (LDC); Lincomicina (LCM); Lomefloxacina (LOM); Marbofloxacina (MAR); Mebendazol (MBZ); Metronidazol (METRO); Miconazole (MIZ); Minociclina (MC); Moxifloxacina (MOX); Nimesulida (NSL); Norfloxacina (NOR); Ofloxacina (OFL); Oxitetraciclina (OTC); Penicilina G (PNC); Prednisona (PDS); Propranolol (PPL); Roxitromicina (RXT); Sarafloxacina (SAR); Sulfabenzamida (SFB); Sulfachinoxalina (SCX); Sulfaclozina (SCZ); Sulfadiazina (SFZ); Sulfadimetoxina (SFD); Sulfadimidina (SFD); Sulfadoxina (SFX); Sulfametazina (SFM); Sulfameter (SFT); Sulfametoxazol (SULFA); Sulfamonometoxina (SMM); Sulfanilamida (SFA); Sulfatiazol (SFO); Teofilina (TEO); Tetraciclina (TC); Tilmicosina (TILMI); Tilosina (TYL); Trimetoprina (TMP).

## 5 Descrição Técnica

### 5.1 Materiais e Reagentes

Os padrões de referência analítica, metronidazol (> 98%) e sulfametoxazol (> 98%), foram obtidos de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). Quer o acetonitrilo quer o metanol utilizados em *HPLC* foram fornecidos por VMR (Fontenay-sous-Bois, France). A água ultrapura foi preparada com um sistema purificador (3 L/h) da Elix Essential Water facilitado pela Merck Millipore (Beeston, Reino Unido). O ácido ortofosfórico (pureza, 85%) foi concedido por VMR (Fontenay-sous-Bois, France).

Para a extração em fase sólida (*SPE*), os cartuchos Oasis HLB (200 mg, 6 cm<sup>3</sup>) foram disponibilizados por Waters Corporation (Dublin, Irlanda). Os sorbentes Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para amostras orgânicas líquidas foram obtidos de Macherey-Nagel (Düren, Alemanha). Os filtros de PTFE (2 µm) foram fornecidos por VMR (EUA). O EDTA (pureza, 99,5%) foi concedido por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). O fosfato de sódio (pureza, 99%) foi disponibilizado por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha). O ácido cítrico (pureza> 99,5%) foi proporcionado por Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

Para os QuEChERS, os filtros de PTFE (2 µm) foram fornecidos por VMR (EUA). O ácido acético (99,8%) foi obtido de E. Merck (Darmstadt, Alemanha). O sulfato de magnésio foi dispensado pela Panreac ITW Companies (Darmstadt, Alemanha). PSA-sílica (100 g) e DSC-18 foram prestados pela Supelico (Bellefonte, USA). O cloreto de sódio (pureza, 99,5%) foi ministrado por E. Merck (Darmstadt, Alemanha).

### 5.2 Metodologias Analíticas

#### 5.2.1 Métodos instrumentais

##### 5.2.1.1 Instrumentação

As análises de cromatografia foram efetuadas utilizando um sistema *Merck Hitachi* (Tóquio, Japão) consistindo numa bomba L-7100 (*Merck Hitachi*), num injetor *Rheodyne* (*Rohnert Park*, EUA) modelo 7725 (100 µL *loop*) e um detetor *DAD L-7450 A* (*Merck Hitachi*). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna RP-18e (250 x 4 mm, 5 µm de tamanho de partícula) e numa pré-coluna *Purospher RP-18e* (4 x 4 mm) fornecida por *Merck* (Darmstadt, Alemanha). Os constituintes da fase móvel, (A) água com pH ajustado recorrendo a ácido fosfórico (pH 2) e (B) acetonitrilo, foram utilizados num programa de gradiente de eluição como a seguir se segue; as condições iniciais do gradiente foram definidas a 10% B e mantidas durante 7 minutos, depois aumentou-se de 10 para 35% B durante 3 minutos e foram mantidas as condições durante 8 minutos, aumentou-se de seguida de 35 para 50% B durante 7 minutos, seguido de aumento de 50 para 100% B durante 1 minuto. A fase móvel voltou à composição inicial durante 14 minutos e a coluna analítica atingiu o equilíbrio antes de se iniciar a próxima corrida. O tempo total de corrida foi de 40 minutos. O volume de injeção foi 100 µL e

todas as separações foram efetuadas à temperatura ambiente. O caudal da fase móvel foi de 0,8 mL/min. A identificação dos antibióticos foi efetuada pela comparação com padrões, relativos ao tempo de retenção e espectro visível destes analitos em LC. A absorção UV destes analitos foi monitorizada ao longo do intervalo de comprimentos de onda compreendidos entre 170 e 900 nm. No entanto, a deteção foi realizada a comprimento de onda de 280 nm quer para a sulfametoxazol quer para o metronidazol. Os dados foram recolhidos e processados pelo *software* HSM D-7000 (versão 3.1) para HPLC. A quantificação foi efetuada utilizando calibração externa.

#### 5.2.1.2 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi desenvolvida em termos de linearidade, repetibilidade (precisão intradiária), precisão intermédia (precisão interdiária) e exatidão.

As soluções padrão *mix* a diferentes concentrações foram diariamente preparadas com a diluição apropriada em água ultrapura a partir das soluções *stock* de sulfametoxazol (212 mg/L) e metronidazol (198 mg/L) conservadas em água ultrapura e 25% de metanol e guardadas a -20 °C.

A linearidade foi estudada por 6 pontos da curva de calibração para o metronidazol e por 7 pontos da curva de calibração para a sulfametoxazol. Para estes analitos, os limites de deteção (*LOD*) e os limites de quantificação (*LOQ*) foram determinados por uma média ( $n = 6$ , METRO;  $n = 7$ , SULFA) rácio sinal-ruído (*S/N*) entre 3 e 10, respetivamente. A repetibilidade foi definida como o desvio-padrão relativo (*RSD*, %) da análise de 6 padrões a 3 níveis de concentração diferentes ( $n=6$ ). A precisão intermédia foi determinada como o *RSD* das injeções em duplicado dos padrões analíticos a 3 níveis de concentração diferentes em 3 dias consecutivos ( $n=6$ ). Adicionalmente, a exatidão foi determinada pelo método de adição de 6 padrões ( $n=6$ ) a 3 níveis de concentração. A água da torneira do laboratório e a água de rio foram contaminadas (*spike*) com as concentrações conhecidas e as recuperações foram determinadas por comparação entre a resposta instrumental e a resposta esperada, considerando o branco, amostra não contaminada (sem *spike*).

#### 5.2.2 Amostragem

A amostragem foi realizada num pequeno quintal no centro da cidade do Porto (Calçada da Póvoa, 41°09'25.0"N 8°35'51.6"W) a uma profundidade oscilante entre os 10-20 cm e a recolha foi composta por três quantidades equivalentes colhidas de três pontos diferentes a fim de eliminar eventuais erros. O solo era composto por terra escura altamente mineralizada, dado tratar-se de uma zona de intenso cultivo de legumes e plantações de árvores de fruto. A recolha foi efetuada no dia 28 de Abril do corrente ano.

#### 5.2.3 Métodos de extração

##### 5.2.3.1 SPE

O procedimento laboratorial de tratamento da amostra envolveu vários passos antes da extração por SPE e teve por base o trabalho experimental realizado por Y. B. Ho *et al.* (2012).

Inicialmente a amostra de solo (4 gramas) foi passada por uma peneira a fim de retirar partículas grosseiras. Posto isto, foi adicionado à amostra o solvente de extração

(Metanol:Acetonitrilo:EDTA:Padrão McIlvaine, na proporção de volumes 30:20:25:25 a pH de 7,1 18 °C). Seguidamente realizado o *spike* ao solo ( $C_{mix} = 2 \text{ mg/L}$ ,  $V=100 \mu\text{L}$ ) a fim de testar o método em causa na remoção destas substâncias quando aderidas ao solo. A amostra assim preparada foi agitada em vórtex durante trinta segundos para correta homogeneização da mesma, sendo de seguida colocada no ultrassons durante dez minutos e centrifugada, a  $2670 \times g$ , durante dez minutos. Finalizada esta etapa efetuou-se uma recolha do sobrenadante e excluiu-se a parte sólida. Esta etapa foi repetida três vezes. Quando perfeito o volume de vinte mililitros de sobrenadante procedeu-se à sua diluição em água ultrapura. Por fim, procedeu-se à extração por *SPE*.

Esta etapa de tratamento ocorreu logo após o pré-tratamento. O processo, também de acordo com Y. B. Ho *et al.* (2012), iniciou-se adicionando três mililitros de metanol e três mililitros de água ultrapura na etapa de condicionamento. Seguidamente procedeu-se à etapa de injeção da amostra. Posto isto, iniciou-se a etapa de lavagem do cartucho (Oasis HLB 6 cc, 200 mg) recorrendo a seis mililitros de água ultrapura. Findada esta fase deu-se início à secagem da amostra a vácuo durante quarenta e cinco minutos. Depois de bem seca a amostra, procedeu-se então à etapa de eluição, que foi realizada pela adição de seis mililitros de metanol. Nesta etapa, foi montado um sistema composto pelos respetivos cartuchos e ampolas das fases anteriores, aos quais se associou um filtro *PTFE* de  $0,2 \mu\text{m}$ , para respetiva filtração da amostra, e um cartucho de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para efetuar a secagem da amostra. Após terminado o *SPE*, levou-se a amostra a uma secagem em corrente de azoto a  $45^\circ\text{C}$ , seguida de reconstituição de um mililitro da amostra, recorrendo para tal a uma solução de metanol e água ultrapura a 25:75, v/v. Analisaram-se posteriormente as amostras por *HPLC-DAD*.

O procedimento encontra-se esquematizado na Figura 15.

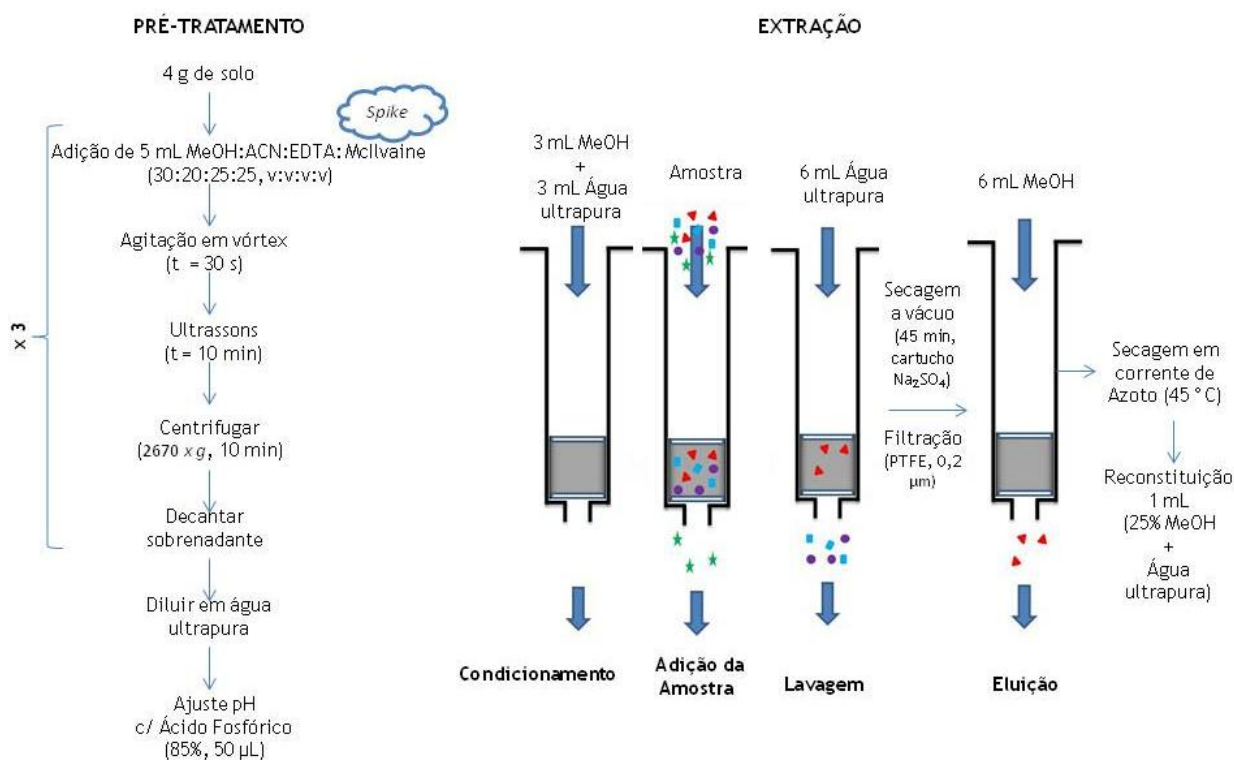


Figura 15 - Esquema do procedimento de pré-tratamento e extração *SPE* aplicado

5.2.3.2 *QuEChERS*

A fim de comparar a eficiência entre métodos de extração, procurou-se definir um protocolo para *QuEChERS* baseado no procedimento realizado por Cerqueira *et al.* (2014) e nas ilações registadas por Bragança *et al.* (2012) e por Vera *et al.* (2013). Nos tubos de *falcon* contendo 4 gramas de solo adicionou-se o solvente de extração (diferentes solventes aplicados explícitos na Tabela 6) e efetuou-se o *spike* da amostra ( $C=5$  e  $2,5$  mg/L,  $100\ \mu\text{L}$ ). Procedeu-se à agitação, em vórtex, dos tubos de *falcon* durante 2 minutos e de seguida levaram-se ao ultrassons durante 10 minutos. Adicionou-se o conteúdo do *QuEChERS I* (6 g  $\text{MgSO}_4$  e 1 g  $\text{NaCl}$ ) previamente pesado aos tubos de *falcon* e agitou-se novamente em vórtex durante 2 minutos. Posto isto, colocaram-se os recipientes na centrífuga a  $2670 \times g$  durante 10 minutos. De seguida, recolheu-se o sobrenadante da amostra e juntou-se ao conteúdo do *QuEChERS II* (1 g  $\text{MgSO}_4$ , 300 mg PSA e 150 mg  $\text{C}_{18}$ ), agitou-se novamente em vórtex durante 2 minutos e centrifugou-se a  $2670 \times g$  durante 10 minutos. Por fim, filtrou-se o sobrenadante com um filtro de PTFE de  $0,2\ \mu\text{m}$  e levou-se à secagem em corrente de azoto. Com a amostra totalmente seca, reconstituiu-se a mesma num mililitro de solução metanol e água ultrapura (25:75, v/v) e analisaram-se as amostras por *HPLC-DAD*.

O procedimento encontra-se esquematizado na Figura 16.

Tabela 6 - Condições utilizadas nas diferentes metodologias de *QuEChERS*

Ensaio	Solvente	Acidificação	Spike
1	Acetonitrilo (pH=1,9 a $18\ ^\circ\text{C}$ )	Sim, com $100\ \mu\text{L}$ de $\text{CH}_3\text{COOH}$	5 mg/L e 2,5 mg/L
2	Acetonitrilo (pH=4,1 a $17,9\ ^\circ\text{C}$ )	Não	5 mg/L e 2,5 mg/L
3	Metanol:Acetonitrilo, 50:50 v/v (pH=6,7 a $17,6\ ^\circ\text{C}$ )	Não	5 mg/L e 2,5 mg/L

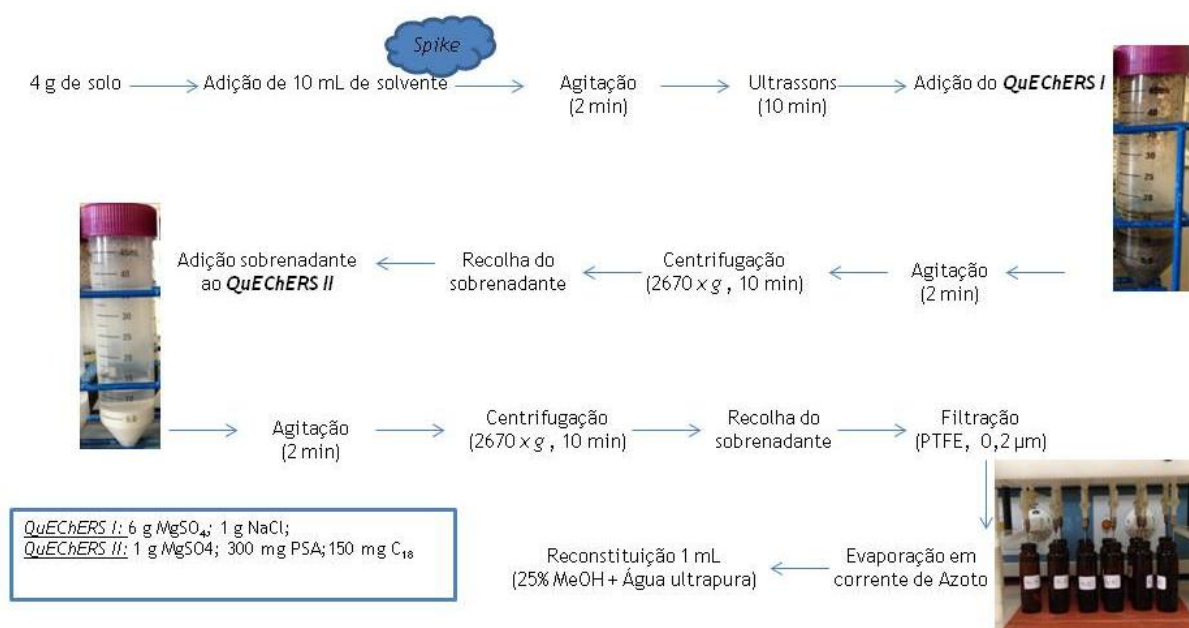


Figura 16 - Esquema do procedimento de *QuEChERS* aplicado



### 5.3 Armazenamento, Destino e Tratamento de Resíduos

Os resíduos líquidos gerados consistem em soluções orgânicas que contém acetonitrilo, metanol e quantidades vestigiais de antibióticos, EDTA, ácido acético, ácido orto-fosfórico, ácido cítrico e fosfato dissódico. Os resíduos sólidos compreendem cartuchos Oasis *HLB*, sorventes  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtros de *PTFE* e amostras de solo contaminadas com  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ , PSA e C18. Os sorventes armazenados de Oasis *HLB* foram reutilizados em estudos MIP pelo grupo de investigação, sendo que os outros resíduos foram recolhidos em recipientes fechados devidamente rotulados e armazenados em locais apropriados sem fontes de luz ou de ignição para futuro tratamento pelo Sistema de Gestão Ambiental da FEUP (EcoFEUP).



## 6 Resultados e Discussão

### 6.1 Validação do método analítico

Para identificar e quantificar os antibióticos metronidazol e sulfametoxazol foi necessário desenvolver, otimizar e validar uma metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada de detetor por arranjo de díodos (*HPLC-DAD*)<sup>(1)</sup>.

Este método também foi validado para toda uma outra panóplia de antibióticos, os quais não foram avaliados neste estudo. A Figura 17 mostra o cromatograma da solução padrão dos analitos observados e monitorizados a 280 nm.

O tempo de retenção e o espectro UV dos compostos são utilizados para identificar os analitos de interesse. Assim, para avaliar os tempos de retenção da sulfametoxazol e do metronidazol, realçados na Figura 17, foi efetuada a injeção direta de soluções analíticas padrão destes compostos.

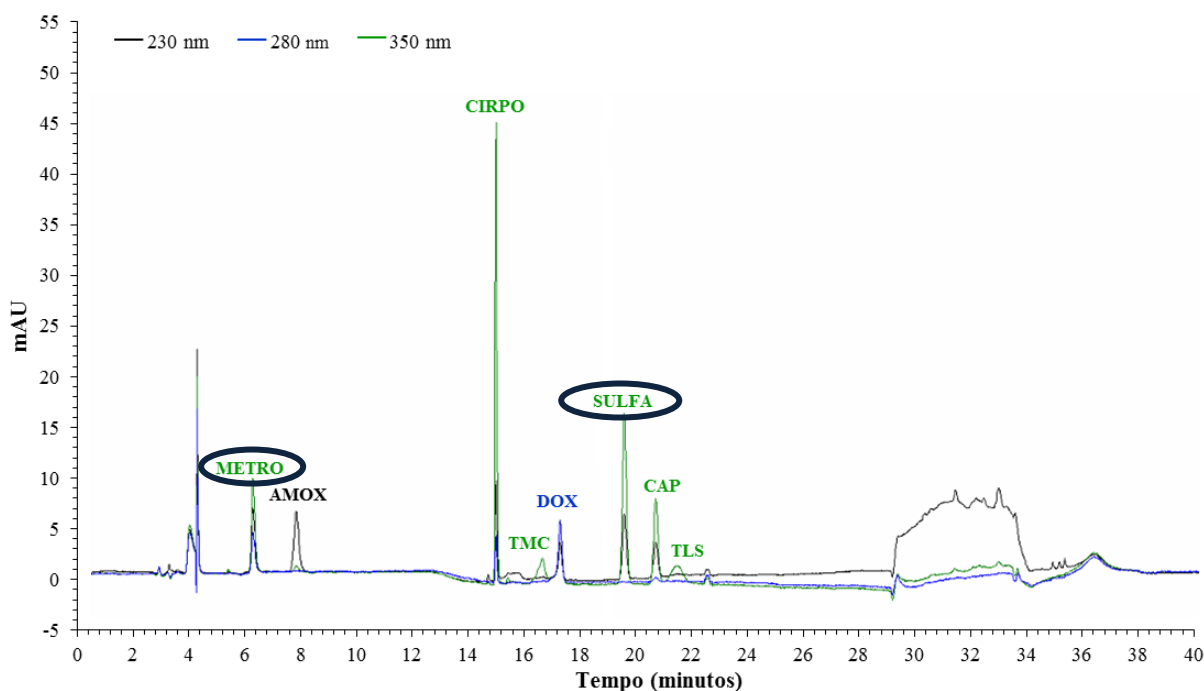


Figura 17 - Cromatograma obtido da análise *HPLC-DAD* de uma solução padrão de 500 µg/L de vários antibióticos (Nota: estão evidenciados com um círculo os antibióticos usados neste estudo)

Nas condições cromatográficas estabelecidas e expressas nas secções anteriores, o tempo de retenção para o metronidazol foi de 5,7 minutos e o da sulfametoxazol foi de 19,3 minutos, variando consoante a temperatura do laboratório (*HPLC* não possui forno). É de notar que a temperaturas mais baixas aumenta a adsorção dos compostos à fase estacionária, ou seja, os compostos são eluídos a tempos de retenção mais elevados. Para eliminar eventuais erros de leitura e permitir a correta análise dos picos de cada analito, foi injetada uma solução padrão *mix* (mistura de solução de metronidazol e solução de sulfametoxazol) antes das análises das amostras referidas.

<sup>(1)</sup> Método validado pela Eng<sup>a</sup> Isabel Carvalho sob o meu conhecimento e acompanhamento.

Por análise dos tempos de retenção concluímos que o metronidazol é mais polar do que a sulfametoxazol, uma vez que a coluna é de fase reversa e este é eluído a menores tempos de retenção, isto é, quando a força de eluição é menor (fase móvel é maioritariamente água). Por oposição, a sulfametoxazol, por ter maior afinidade com a fase estacionária, só é eluída quando a força de eluição é maior (fase móvel é maioritariamente acetonitrilo).

Para a validação instrumental do método analítico os parâmetros utilizados foram a linearidade, a repetibilidade, a precisão intermédia e a exatidão.

### 6.1.1 Linearidade e limites de deteção e quantificação

A calibração foi efetuada a 6 níveis de concentração, na gama de 50-500 µg/L para a METRO, e a 7 níveis de concentração, na gama de 20-500 µg/L para a SULFA, tendo sido efetuadas analisadas em duplicado das soluções respetivas. A Figura 18 apresenta as curvas de calibração dos dois analitos (intervalo de confiança 95%).

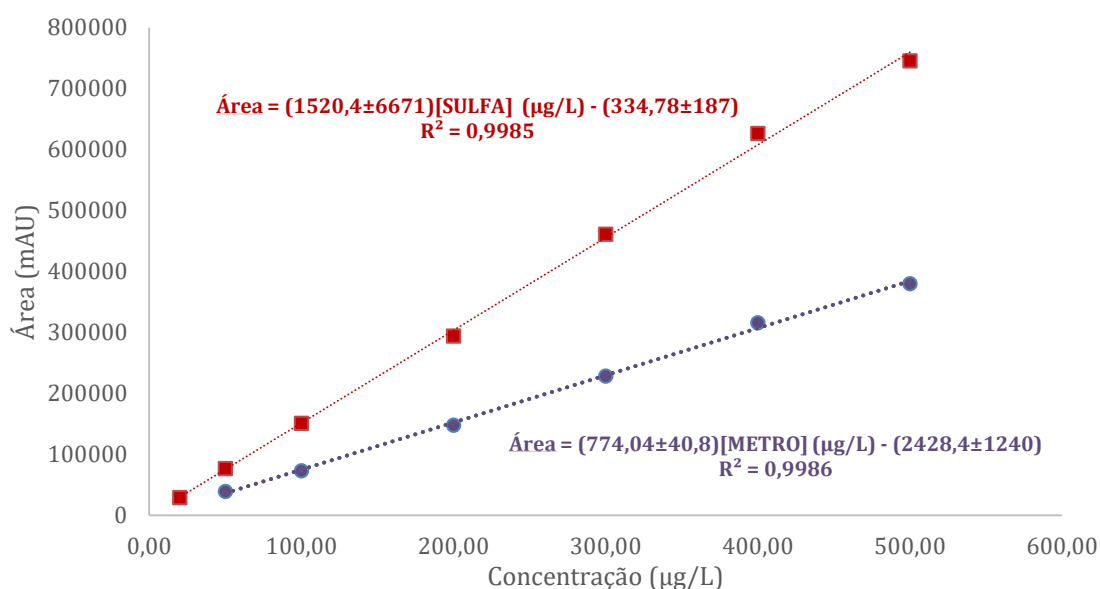


Figura 18 - Curvas de calibração metronidazol e sulfametoxazol

Na Tabela 7 encontram-se sumarizados os principais parâmetros analíticos. O método dos mínimos quadrados foi utilizado para calcular o declive, a interceção e o coeficiente de correlação da reta de regressão. Os limites de deteção e quantificação foram cálculos pela média (n=6 para o metronidazol; n=7 para a sulfametoxazol) do rácio sinal-ruído (S/N) entre 3 e 10, respetivamente.

Tabela 7 - Parâmetros analíticos

Analito	Gama de linearidade	Declive $\pm ts_a$ ((mAU.L)/µg)	Interceção $\pm ts_b$ (mAU)	Coeficiente de correlação	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
METRO	50-500	774 $\pm$ 41	-2428 $\pm$ 12375	0,9993	14	47
SULFA	20-500	1520 $\pm$ 67	-335 $\pm$ 18735	0,9993	5	17

$ts_a$  – intervalo de confiança do declive (8 graus de liberdade; nível de confiança de 95%);  $ts_b$  – intervalo de confiança da interceção (8 graus de liberdade; nível de confiança de 95%).

O método analítico mostrou ser mais sensível para a determinação da sulfametoxazol do que para o metronidazol, isto porque o declive da curva de calibração é maior para o primeiro composto mencionado.

O controlo de qualidade em laboratório tipicamente considera 3 critérios para validação da curva de calibração: (i) desvio-padrão relativo do declive ( $\frac{sa}{a} \times 100$ ) menor que 5%; (ii) conter a origem ( $b - s_b < 0 < b + s_b$ ); e (iii) o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,995 (Miller and Miller 2010).

Todos os critérios mencionados mostraram estar de acordo com os parâmetros teoricamente exigidos para ambos os analitos. O desvio-padrão relativo do declive para as curvas de calibração do metronidazol e da sulfametoxazol foi de 1,90% e 1,71%, respetivamente. Ambos os casos contêm a origem:  $b - s_b = -6885,63 < 0 < b + s_b = 2028,88$ , para a curva de calibração do metronidazol, e  $b - s_b = -7622,91 < 0 < b + s_b = 6953,35$ , para a curva de calibração da sulfametoxazol. Os coeficientes de correlação também foram superiores a 0,995, como é visível por análise da Tabela 7, indicando uma boa linearidade para a gama de concentrações estudada. Constata-se, assim, que as curvas de calibração obtidas são passíveis de ser usadas em análises de amostras contendo estes compostos.

### 6.1.2 Precisão

A precisão pode ser definida como o grau de dispersão entre a série de resultados de uma mesma amostra. Neste estudo, a precisão intermédia e a repetibilidade foram determinadas para avaliar o método analítico. A repetibilidade expressa a precisão para as mesmas condições de operação num curto intervalo de tempo, sendo estimada neste estudo pelo desvio-padrão relativo (*RSD*, %) de 6 leituras do mesmo padrão, nas mesmas condições experimentais e num curto período de tempo. A precisão intermédia expressa a variação das condições laboratoriais, sendo representada neste estudo pelo *RSD* da injeção em duplicado, do padrão analítico, a 3 níveis de concentração, variando o dia de análise. Os resultados encontram-se representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do estudo da precisão do método analítico

Analito	Repetibilidade ( <i>RSD</i> , %) (n = 6)			Precisão Intermédia ( <i>RSD</i> , %) (n = 6)		
	(µg/L)			(µg/L)		
	50	200	500	50	200	500
METRO	7,6	2,8	2,3	3,6	3,4	2,6
SULFA	4,2	1,9	1,1	5,3	2,7	2,2

Analisando a Tabela 8 é de notar que o *RSD* diminui com o aumento da concentração, como era expectável, isto significa, que a precisão aumenta com o aumento da concentração. A gama de precisão foi de 1,1 a 7,6% e de 2,2 a 5,3%, condições intra-dia e inter-dias, respetivamente. O único valor que se encontra fora dos limites teoricamente exigidos (*RSD*<5%) é obtido para a mais baixa concentração (50 µg/L), onde a precisão costuma ser normalmente menor, por isso não se considerou relevante. Desta forma, pode-se concluir que os resultados exprimem que o método é preciso.

### 6.1.3 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico pode ser definida como o grau de concordância entre o valor real e o valor de referência. Neste estudo, a exatidão foi estimada através de um teste de

recuperação analítica, com o intuito de avaliar a adequabilidade do método desenvolvido para a determinação de antibióticos-alvo em amostras reais. Contudo, os antibióticos presentes em amostras de solos ou lamas não podem ser analisados por este procedimento analítico sem à priori ter sido realizado um *clean-up* da amostra e a respetiva extração, por uma metodologia adequada. A exatidão do método foi determinada utilizando água da torneira e água de rio que foram contaminadas (*spike*) a 3 níveis de concentração. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 9.

Não foram visíveis picos cromatográficos dos antibióticos em estudo no branco (água da torneira sem *spike*).

Tabela 9 - Resultados do estudo da exatidão do método analítico em água da torneira e água de rio

Analito	Recuperação $\pm$ RSD (%) (n = 6)							
	Água da torneira ( $\mu\text{g/L}$ )				Água de rio ( $\mu\text{g/L}$ )			
	50	200	500	Final	50	200	500	Final
METRO	98 $\pm$ 3	101 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	99 $\pm$ 2	96 $\pm$ 3	102 $\pm$ 2	97 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2
SULFA	99 $\pm$ 2	103 $\pm$ 2	99,7 $\pm$ 0,6	101 $\pm$ 2	101 $\pm$ 2	102,7 $\pm$ 0,7	99,4 $\pm$ 0,5	101 $\pm$ 1

A recuperação foi de 99 $\pm$ 2 para o metronidazol e 101 $\pm$ 2 para a sulfametoxazol para a água da torneira, e de 98 $\pm$ 2 para o metronidazol e 101 $\pm$ 1 para a sulfametoxazol para a água de rio. Foram, assim, obtidas boas percentagens de recuperação e baixos *RSD*, o que significa que este método analítico permite uma avaliação exata de estudos de antibióticos em amostras representativas.

## 6.2 Extração

Para o estudo em causa foram utilizadas amostras de solo, as quais foram submetidas a ensaios de *clean-up*/pré-concentração.

Na literatura, um dos métodos mais descritos para a extração de antibióticos dos solos através de uma componente líquida é a extração em fase sólida. Desta forma, numa etapa inicial foi testado o procedimento exemplificado na Figura 15. Os resultados obtidos após análise por *HPLC-DAD* demonstram que este método é ineficaz na remoção dos compostos de interesse - a sulfametoxazol e o metronidazol, atendendo à dificuldade de identificação dos picos dos antibióticos em estudo tal como ilustrado na Figura 19. A Figura 19 apresenta o cromatograma obtido por análise em cromatografia líquida acoplada de detetor de arranjo de díodos (*HPLC-DAD*) de uma amostra de solo contaminada com uma solução *mix* de sulfametoxazol e metronidazol (C= 500  $\mu\text{g/L}$ ) após extração dos analitos de interesse por *SPE*.

Assim sendo considerou-se que este método não era viável para o estudo em causa, porque dado a sua ineficiência num solo simples torna-se impraticável ser aplicado a amostras representativas.

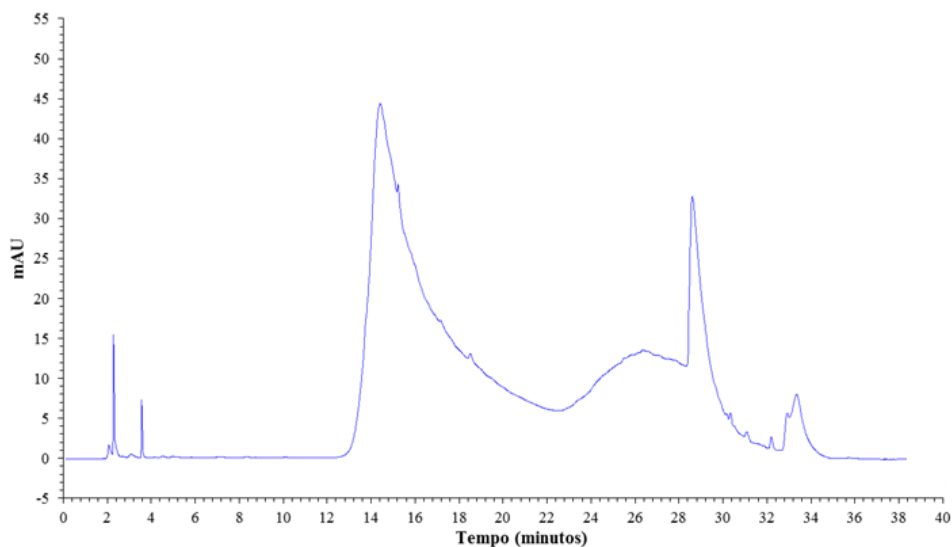


Figura 19 - Cromatograma obtido da análise *HPLC-DAD* de uma amostra de solo contaminada com uma solução mix de 500 µg/L após extração por *SPE*

Como alternativa optou-se por testar um outro método de extração - *QuEChERS* - sendo que o procedimento se encontra descrito na Figura 16. Neste procedimento já foi possível identificar os picos referentes ao metronidazol e à sulfametoxazol por análise *HPLC-DAD*. O tempo de retenção do metronidazol oscilou entre os 4,9 e os 5,6 min e o tempo de retenção da sulfametoxazol oscilou entre 18,4 e os 19,1 min, consoante a temperatura ambiente. Para eliminar eventuais erros, foi injetada uma solução padrão *mix* dos antibióticos em estudo com concentração igual à teoricamente esperada (uma de 2,5 mg/L e outra de 5 mg/L). A Figura 20 apresenta o cromatograma obtido por análise *HPLC-DAD* de uma amostra de solo comum contaminada com uma solução *mix* de sulfametoxazol e metronidazol (500 µg/L) após extração dos analitos de interesse por *QuEChERS*, utilizando como solvente de extração ACN:MeOH (50:50, v/v) - ensaio 3'. Neste ensaio, os tempos de retenção foram 5,3 para o metronidazol e 18,7 min para a sulfametoxazol.

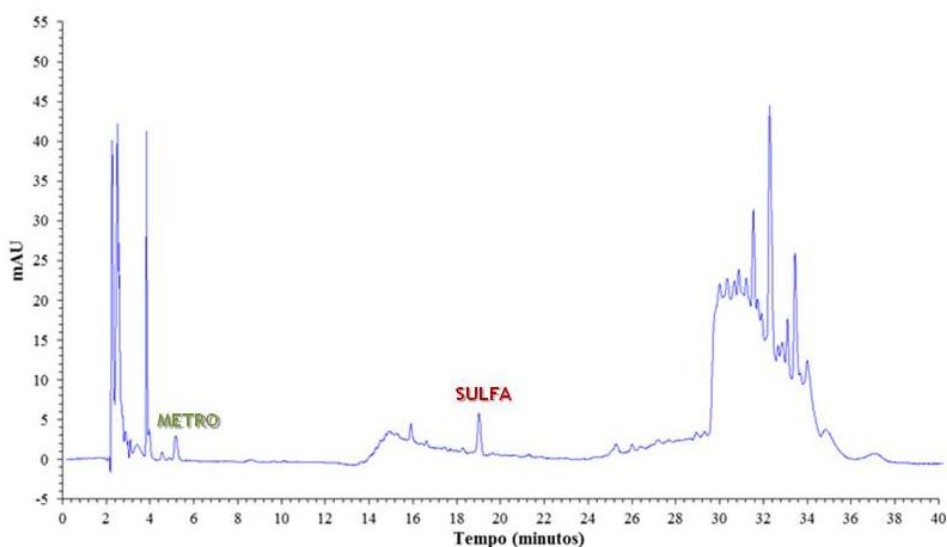


Figura 20 - Cromatograma obtido da análise *HPLC-DAD* de uma amostra de solo contaminada com uma solução mix de 500 µg/L após extração por *QuEChERS* (ensaio 3')

Na Tabela 10 e na Tabela 11 encontram-se representadas as percentagens de recuperação obtidas nos vários ensaios de *QuEChERS* para os dois compostos em análise.

**Tabela 10 - Percentagens de recuperação obtidas nos diferentes ensaios de *QuEChERS* para o metronidazol**

Metro			
Ensaio	Solvente	% Recuperação ( <i>Spike</i> 5mg/L)	% Recuperação ( <i>Spike</i> 2,5mg/L)
1	ACN (pH=1,9 a 18,0 °C) + 100 µL de CH <sub>3</sub> COOH	46,9	24,1
2	ACN (pH=4,1 a 17,9 °C)	41,0	44,3
3	ACN:MeOH, 50:50 v/v (pH=6,7 a 17,6 °C)	48,7	40,6
3'	ACN:MeOH, 50:50 v/v (pH=6,7 a 17,6 °C)	52,3	55,3

**Tabela 11 - Percentagens de recuperação obtidas nos diferentes ensaios de *QuEChERS* para a sulfametoxazol**

Sulfa			
Ensaio	Solvente	% Recuperação ( <i>Spike</i> 5mg/L)	% Recuperação ( <i>Spike</i> 2,5mg/L)
1	ACN (pH=1,9 a 18 °C) + 100 µL de CH <sub>3</sub> COOH	36,4	19,1
2	ACN (pH=4,1 a 17,9 °C)	14,1	19,5
3	ACN:MeOH, 50:50 v/v (pH=6,7 a 17,6 °C)	48,5	46,3
3'	ACN:MeOH, 50:50 v/v (pH=6,7 a 17,6 °C)	47,4	49,3

Assim, da análise dos resultados obtidos constata-se que a melhor metodologia foi a do ensaio *QuEChERS* 3 (ou 3') onde se utilizou a mistura de solventes ACN:MeOH (50:50, v/v), atendendo à obtenção de maiores percentagens de recuperação. Foi mesmo o único caso em que as percentagens de recuperação foram mais semelhantes para os dois compostos. Pelo contrário, para as restantes condições, as percentagens de recuperação para a sulfametoxazol foram sempre muito inferiores às obtidas para o metronidazol.

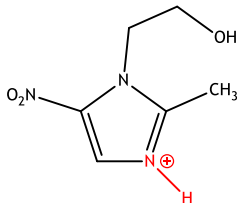
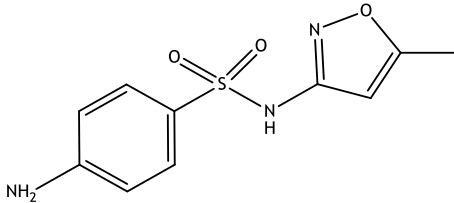
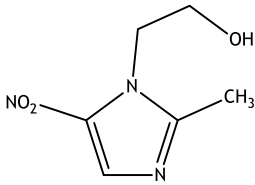
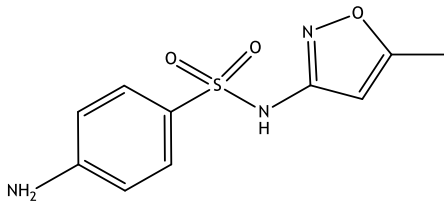
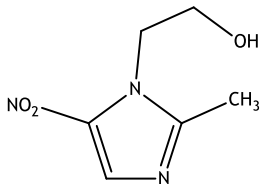
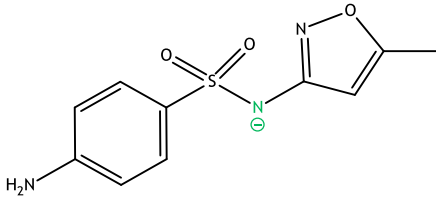
Contudo, é possível que as percentagens de recuperação nos ensaio 1 a 3 possam representar o valor obtido por defeito devido a avaria no equipamento de análise cromatográfica, o *HPLC*, uma vez que durante as injeções desses extratos, existiram pequenas fugas na agulha do injetor que podem ter afetado as leituras dos compostos. Por este mesmo motivo, o ensaio com melhores resultados foi repetido após se ter procedido à manutenção do equipamento, encontrando-se os resultados obtidos descritos no ensaio 3' da Tabela 10 e da Tabela 11.

Apesar das condicionantes verificadas com o equipamento foi possível concluir que o valor do pH do eluente condiciona os resultados obtidos (ver secção Métodos de extração). A

Tabela 12 apresenta as fórmulas de estrutura do metronidazol e da sulfametoxazol nos diferentes ensaios consoante o pH de operação, tendo em atenção os respetivos valores de  $pK_a$ .



Tabela 12 - Forma iônica ou neutra do metronidazol e da sulfametoxazol aos diferentes valores de pH

Ensaio	pH	Forma METRO	Forma SULFA
1	1,9	 <p>Maioritariamente carregado positivamente</p>	 <p>Neutro</p>
2	4,1	 <p>Neutro</p>	 <p>Neutro</p>
3	6,7	 <p>Neutro</p>	 <p>Maioritariamente carregado negativamente</p>

**Nota:** Metronidazol,  $pK_{a1}=2,4$  |  $pK_{a2}=14,4$ ; Sulfametoxazol,  $pK_{a1}=1,6$  |  $pK_{a2}=5,7$

Como é de notar, o metronidazol apenas no ensaio 1 se encontra com protonado, podendo estabelecer interações com compostos carregados negativamente (aniões) existentes no solo. A sulfametoxazol apenas no ensaio 3 se encontra desprotonada estando, por isso, apta a estabelecer interações com compostos carregados positivamente (catiões), tais como metais pesados ou nutrientes, que se encontram no solos e nas lamas de depuração de ETAR's. Em todos os restantes ensaios as moléculas encontram-se neutras, não existindo este tipo de interação (ião-ião). Pode, no entanto, existir outro tipo de interações intermoleculares, nomeadamente ligações de hidrogénio, dipolo-dipolo, etc, entre os antibióticos e a matéria orgânica existente no solo.

É também importante relacionar o tipo de interações que se podem ter estabelecido entre os antibióticos em estudo e os compostos adicionados em cada etapa do procedimento *QuEChERS*. A Figura 21 representa a estrutura do PSA, componente adicionado no *QuEChERS II*, que devido à existência de grupos amino primários e secundários (com valores de  $pK_a$  de 10,1 e 10,9, respetivamente) tem elevadas capacidades de interações ião-ião, dipolo-dipolo e ligações por pontes de hidrogénio, dependendo do valor de pH.

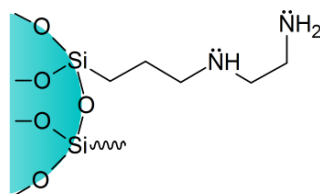


Figura 21 - Estrutura do PSA

Portanto, este composto pode estabelecer ligações com os analitos que se pretendem remover fazendo com que os mesmos fiquem retidos na fase sólida e não sejam extraídos com o solvente utilizado. Assim, o extrato analisado por cromatografia líquida (*HPLC-DAD*), não contém os antibióticos, ou apenas contém uma parte deles, o que diminui a percentagem de extração. No entanto, o método mostrou ser eficaz no *clean-up* da amostra, pois o cromatograma obtido permitiu visualizar os antibióticos em estudo.

Mas muitas outras condições podem ter originado as baixas recuperações obtidas. O tempo de permanência no ultrassons (10 minutos), após adição do solvente de extração e *spike* da amostra, pode não ter sido suficiente para que se desse a correta homogeneização da amostra sólida com a fase líquida. Por outro lado, o solvente de extração pode não ter a polaridade ideal para permitir a extração dos compostos de interesse, visto que os dois antibióticos utilizados não apresentam uma tendência significativa para ficarem aderidos a amostras sólidas ( $K_{ow} < 1$ ). O tempo de agitação também pode não ter sido suficiente para que o sulfato de magnésio e o cloreto de sódio fossem capazes de induzir a separação por fases ou que o PSA e o C18 fossem capazes de remover toda a matéria orgânica, fazendo que com os interferentes se fizessem sentir nas análises. O tempo de centrifuga também pode ter ultrapassado o ótimo pretendido, alguns autores usam menores tempos (Cerqueira *et al.* 2014), permitindo o estabelecimento de ligações entre alguns compostos, o que não é o pretendido.

No entanto, as percentagens à volta dos 50% são indicativas de que o método poderia ser utilizado para extração dos analitos em causa, contudo alguns dos parâmetros atrás mencionados deveriam ter sido testados, o que não aconteceu por falta de tempo e disponibilidade de equipamento/material.

Se existisse legislação específica para antibióticos nos solos, com os respetivos valores limite de emissão (VLE), analisando a concentração final de cada um dos antibióticos, poder-se-ia concluir se o método seria válido para o tratamento de amostras de solo contaminadas. Não existindo, apenas se pode concluir que o método é eficaz no *clean-up* da amostra e na extração dos analitos de interesse. Contudo, as condições de operação devem ser otimizadas e o método tem de ser aplicável a amostras de solo e lamas de depuração de ETAR's representativas, isto é, onde a percentagem deste tipo de analitos seja significativa.

## 7 Conclusões

Mundialmente milhares de antibióticos são utilizados em medicina humana e veterinária para combater diversas estirpes de microrganismos, sendo excretados pelos organismos e aparecendo livremente no ambiente. Posto isto, repartem-se sobretudo entre duas fases principais: a água (rios, lagos, lençóis freáticos, etc) e o solo e os seus sedimentos, provocando graves impactes ambientais e aumentando a resistência antimicrobiana. Por estes motivos, torna-se cada vez mais crucial diminuir a quantidade destes poluentes emergentes no ambiente, através de métodos de degradação/remoção, e prevenir a sua ocorrência, diminuindo o consumo e monitorizando-os. A *StARE (Stopping Antibiotic Resistance Evolution)*, em cooperação com a *WATER JPI*, têm procurado formas de diminuir o nível destes contaminantes, sobretudo nas águas, apresentando como uma solução a monitorização destes mesmos compostos nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR's). Um outro passo implica a implementação de legislação para estes poluentes, que ainda não se encontram na lista de poluentes prioritários (Parlamento Europeu 2013).

Neste trabalho, um método analítico, baseado no gradiente de eluição, foi desenvolvido, otimizado e validado para a análise simultânea de dois antibióticos, o metronidazol e a sulfametoxazol, em *HPLC-DAD*. Os coeficientes de correlação das curvas de calibração foram de 0,9993 em água ultrtrapura, demonstrando a boa linearidade do método na gama de 50 - 500 µg/L para o metronidazol e 20 - 500 µg/L para o sulfametoxazol. Os limites de deteção variaram entre 14 µg/L para o metronidazol e 5 µg/L para a sulfametoxazol, o que significa que o método é aplicável na determinação destes compostos em amostras reais. A repetibilidade e a precisão intermédia apresentaram valores inferiores a 7,6 para o metronidazol e inferiores a 4,3 para a sulfametoxazol, indicando que o método é preciso. Boas recuperações foram obtidas a 3 níveis de concentração em água da torneira e água de rio, o que sustenta a aplicabilidade do método para determinar os antibióticos-alvo em matrizes reais com características físico-químicas semelhantes às matrizes ensaiadas.

Contudo, o método analítico desenvolvido não pode ser aplicado sem antes se proceder a um método de *clean-up* e extração da amostra. Desta forma, testou-se duas metodologias para extração do metronidazol e da sulfametoxazol de uma amostra de solo - *SPE* e *QuEChERS*. A metodologia *SPE* foi ineficaz no *clean-up* da amostra, não permitindo saber se ocorreu ou não a extração dos analitos, uma vez que ocorreu a co-eluição de interferentes. Foram então testadas três metodologias de *QuEChERS* tendo-se obtido percentagens de recuperação entre os 24,1 a 55,3% para o metronidazol e entre 14,1 a 49,3% para a sulfametoxazol. Os melhores resultados foram os obtidos para o solvente ACN:MeOH (50:50, v/v), as percentagens de recuperação rondaram sempre os 50%. Consideram-se que estes resultados são indicativos que o método poderá ser aplicado desde que se realizem outros ensaios alterando mais alguns parâmetros/condições de forma a melhorar as percentagens de recuperação. Sugere-se que em ensaios futuros se otimizem as condições de operação e se proceda à validação do método, contudo em vez de utilizar *HPLC-DAD* se opte por *LC-MS*, para garantir que se estão a analisar os antibióticos pretendidos.



## 8 Limitações e Trabalho Futuro

O grande propósito de uma dissertação de mestrado é permitir ao aluno alargar os seus horizontes e adquirir novas competências dentro da área que se propõe a exercer. Posto isto, os objetivos maioritários deste trabalho foram cumpridos, contudo a obtenção de melhor sucesso no trabalho laboratorial foi condicionada por alguma avarias e falta de disponibilidade de equipamento.

O tempo e os equipamentos disponíveis foram as maiores condicionantes no decorrer deste trabalho. Aliás, as avarias sucessivas do aparelho utilizado para efetuar as análises cromatográficas (HPLC) afetaram os resultados obtidos, bem como a realização total do protocolo estipulado inicialmente.

Com maiores recursos económicos e mais tempo seria preponderante testar a variação de outras condições protocolares, tais como, o tempo de agitação, a composição de cada *QuEChERS*, o tempo de centrifuga bem como de ultrassons, a acidificação do solvente com o qual se obteve melhores resultados, entre outras.

Num cenário ideal, com os recursos necessários, era importante otimizar as condições do método em que se obteve melhores resultados e efetuar a sua validação. Para além disso, testar outros antibióticos com importância na medicina veterinária, como a doxiciclina e a amoxicilina, era importante, a fim de averiguar a adequabilidade do método para uma maior gama de analitos de interesse.

A análise de amostras reais representativas seria de elevada relevância. Quer amostras de zonas com intensa atividade agrícola e pecuária, quer amostras de lamas de depuração de ETAR's onde existem vários resíduos de antibióticos utilizados em medicina humana.

O passo seguinte passaria por compreender como o tipo de solo bem como as espécies vegetais interferem na extração desses analitos. Aliás, do ponto de vista ambiental, era deveras interessante compreender até que ponto as próprias plantas poderiam ser úteis para remover estes poluentes dos solos, como já são utilizadas em tratamentos de biorremediação para outros compostos (Gaylarde *et al.* 2005; J. A. Andrade , F. Augusto 2010).



## Referências

- AGISAR (2011) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine - 3rd Revision. World Heal Organ 1-38.
- Akimenko YV, Kazeev KS, Kolesnikov SI (2015) Impact assessment of soil contamination with antibiotics (For example, an ordinary chernozem). *Am J Appl Sci* 12:80-88. doi: 10.3844/ajassp.2015.80.88
- Aminov RI, Otto M, Sommer A (2010) A brief history of the antibiotic era : lessons learned and challenges for the future. 1:1-7. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134
- Anastassiades et al (2003) Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. *J AOAC Int* 86:412-431.
- Andreu V, Vazquez-Roig P, Blasco C, Picó Y (2009) Determination of tetracycline residues in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 394:1329-1339. doi: 10.1007/s00216-009-2635-x
- Aquino S De (2013) Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Eng Sanit ...* 187-204. doi: 10.1590/S1413-41522013000300002
- Awad YM, Kim SC, Abd El-Azeem SAM, et al (2014) Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environ Earth Sci* 71:1433-1440. doi: 10.1007/s12665-013-2548-z
- Babić S, Petrović M, Kaštelan-Macan M (1998) Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. *J Chromatogr A* 823:3-9. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00301-X
- Bash E (2015) Chapter 5 - Occurrence, effects and methods for antibiotics and illicit drugs in the environment. *PhD Propos* 1:1-35. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Batchu SR, Panditi VR, O'Shea KE, Gardinali PR (2014) Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: Implications for their environmental fate. *Sci Total Environ* 470-471:299-310. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.057
- Bbosa GS, Mwebaza N, Odda J, et al (2014) Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health (Irvine Calif)* 06:410-425. doi: 10.4236/health.2014.65059
- Berendsen BJA (2013) LC-MS residue analysis of antibiotics What selectivity is adequate? Wageningen
- Biocompare (2016) Diode Array HPLC Detectors. <http://www.biocompare.com/Lab-Equipment/11699-Diode-Array-HPLC-Detectors/>. Accessed 2 Mar 2016
- Biziuk M (2006) Solid Phase Extraction Technique - Trends , Opportunities and Applications. *Polish J Environ Stud* 15:677-690.
- Bjerrum CL and L (2004) Background for Different Use of Antibiotics in Different Countries. *Clin infect Dis* 40:333. doi: 10.1086/427035
- Bragança I, Plácido A, Paíga P, et al (2012) QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Sci Total Environ* 433:281-289. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.035
- Brooks G, Burgess W, Colthurst D, et al (2001) Pleuromutilins. Part 1: The identification of novel mutilin 14-carbamates. *Bioorganic Med Chem* 9:1221-1231. doi: 10.1016/S0968-0896(00)00338-2
- Caglar S, Morello R, Boos KS (2015) Development and validation of an on-line multidimensional SPE-LC-MS/MS method for the quantitation of Tetrandrine in blood samples. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 988:25-32. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.02.021
- Calabrese I, Cavallaro G, Scialabba C, et al (2013) Montmorillonite nanodevices for the colon metronidazole delivery. *Int J Pharm* 457:224-236. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.09.017
- Caldas SS, Bolzan CM, Cerqueira MB, et al (2011) Evaluation of a modified QuEChERS extraction of multiple classes of pesticides from a rice paddy soil by LC-APCI-MS/MS. *J Agric Food Chem* 59:11918-11926. doi: 10.1021/jf202878s
- Çalışkan E, Göktürk S (2010) Adsorption Characteristics of Sulfamethoxazole and Metronidazole on

- Activated Carbon. *Sep Sci Technol* 45:244-255. doi: 10.1080/01496390903409419
- Carrales-Alvarado DH, Ocampo-Pérez R, Leyva-Ramos R, Rivera-Utrilla J (2014) Removal of the antibiotic metronidazole by adsorption on various carbon materials from aqueous phase. *J Colloid Interface Sci* 436:276-285. doi: 10.1016/j.jcis.2014.08.023
- CDDEP (2015) State of the world's antibiotics, 2015, CDDEP: Washington, D. C. Washington, D.C.
- Cerqueira MBR, Guilherme JR, Caldas SS, et al (2014) Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere* 107:74-82. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.026
- Chu DT, Fernandes PB (1989) Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 33:131-135. doi: 10.1128/AAC.33.2.131
- Chust RB (1990) Introdução Cromatografia de Líquidos. *Bol SPQ* 39:43-54.
- Cook M, Molto E, Anderson C (1989) Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *Am J Phys Anthropol* 80:137-43. doi: 10.1002/ajpa.1330800202
- Correia-Sá L, Fernandes VC, Carvalho M, et al (2012) Optimization of QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in soils with diverse organic matter. *J Sep Sci* 35:1521-1530. doi: 10.1002/jssc.201200087
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457-61. doi: 10.1038/nature10388
- Dasgupta D, Sengupta TK (2015) Techniques and Methods: Detection of antibiotics in environmental samples. Mohanpur
- DGAV (2011) Relatório nacional de monitorização do consumo de antimicrobianos: Portugal 2011. 1-11.
- DGV (2010) Relatório nacional de monitorização do consumo de antimicrobianos: Portugal 2010. Lisboa
- Díaz-Cruz MS, López De Alda MJ, Barceló D (2003) Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC - Trends Anal Chem* 22:340-351. doi: 10.1016/S0165-9936(03)00603-4
- Dorival-García N, Labajo-Recio C, Zafra-Gómez A, et al (2015) Improved sample treatment for the determination of 17 strong sorbed quinolone antibiotics from compost by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 138:247-257. doi: 10.1016/j.talanta.2015.03.011
- DrugFuture (2016) Tilmicosin. <http://www.drugfuture.com/chemdata/tilmicosin.html>. Accessed 4 Mar 2016
- ECDC (2016) Antimicrobial consumption interactive database. [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/esac-net-database/Pages/database.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/database.aspx). Accessed 1 Jun 2016
- ECDC (2014) Distribution of Antibacterials For Systemic Use (ATC group J01) in the community (primary care sector) in Austria. [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/esac-net-database/Pages/consumption-rates-by-country.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/consumption-rates-by-country.aspx). Accessed 15 Jun 2016
- European Commission (2015) Soil - Environment. [http://ec.europa.eu/environment/soil/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/soil/index_en.htm). Accessed 15 Mar 2016
- European Medicines Agency (2013) Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU / EEA countries in Third ESVAC report. London
- Falagas ME, Kasiakou SK (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 40:1333-1341. doi: 10.1097/01.inf.0000174577.97635.7b
- Ferrone V, Carlucci M, Palumbo P, Carlucci G (2016) Bioanalytical method development for quantification of ulifloxacin, fenbufen and felbinac in rat plasma by solid-phase extraction (SPE) and HPLC with PDA detection. *J Pharm Biomed Anal* 1-8. doi: 10.1016/j.jpba.2016.01.062
- Fontana AR, Camargo A, Martinez LD, Altamirano JC (2011) Dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up technique for biological sample extracts. Determination of polybrominated



- diphenyl ethers by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:2490-2496. doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.058
- Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, et al (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* 337:1107-11. doi: 10.1126/science.1220761
- Gaylarde CC, Bellinaso MDL, Manfio GP (2005) Biorremediação: Aspectos Biológicos e Técnicos da Biorremediação de Xenobióticos. *Biotechnol Ciência e Desenvol* 34:36 - 43.
- Gómez-Caro LC, Sánchez-Sánchez M, Bocanegra-García V, et al (2011) Synthesis of quinoxaline 1,4-di-n-oxide derivatives on solid support using room temperature and microwave-assisted solvent-free procedures. *Quim Nova* 34:1147-1151.
- Gothwal R, Shashidhar T (2015) Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *Clean - Soil, Air, Water* 43:479-489. doi: 10.1002/clen.201300989
- Gottlieb D (1976) The production and role of antibiotics in soil. *J Antibiot (Tokyo)* 29:987-1000.
- Götz A, Smalla K (1997) Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Appl Environ Microbiol* 63:1980-1986.
- Guo C, Wang M, Xiao H, et al (2016) Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1027:110-118. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.05.034
- Hamscher G, Pawelzick HT, Hoper H, et al (2005) Different behaviour of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ Toxicol Chem* 24:861-868. doi: 10.1897/04-182R.1
- Hamscher G, Pawelzick HT, Höper H, Nau H (2004) Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 139-147
- He Z, Zhang H (2014) Applied manure and nutrient chemistry for sustainable agriculture and environment. *Appl. Manure Nutr. Chem. Sustain. Agric. Environ.* 1-379.
- Ho Y Bin, Zakaria MP, Latif PA, Saari N (2014) Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agricultural soil in Malaysia. *Sci Total Environ* 488-489:261-267. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.109
- Ho YB, Zakaria MP, Latif PA, Saari N (2012) Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil and manure compost by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1262:160-168. doi: 10.1016/j.chroma.2012.09.024
- Homem V, Alves A, Santos L (2010) Amoxicillin degradation at ppb levels by Fenton's oxidation using design of experiments. *Sci Total Environ* 408:6272-6280. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.08.058
- Homem V, Santos L (2011) Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review. *J Environ Manage* 92:2304-2347. doi: 10.1016/j.jenvman.2011.05.023
- Hopkins ZR, Blaney L (2013) A novel approach to modeling the reaction kinetics of tetracycline antibiotics with aqueous ozone. *Sci Total Environ* 468-469:337-344. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.032
- Huang C-H et al (2001) A ssessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. 120:30-40.
- Huang Y, Cheng M, Li W, et al (2013) Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method. In: *Analytical Methods*. pp 3721-3731
- J. A. Andrade , F. Augusto ICSFJ (2010) Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét Quim* 35:17-43. doi: 10.1590/S0100-46702010000300002
- Jechalke S, Heuer H, Siemens J, et al (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol* 22:536-545. doi: 10.1016/j.tim.2014.05.005
- Jjemba PK (2002) The effect of chloroquine , quinacrine , and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. 46:1019-1025.
- Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8:1-13.

doi: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002

- Khosla R, Verma DD, Kapur A, et al (1999) Streptogramins: a new class of antibiotics. *Indian J Med Sci* 53:111-9.
- Kim H-J, Lee H-J, Lee D-S, Kwon J-H (2009) Modeling the Fate of Priority Pharmaceuticals in Korea in a Conventional Sewage Treatment Plant. *Environ Eng Res* 14:186-194. doi: 10.4491/eer.2009.14.3.186
- Kim K-R, Owens G, Kwon S-I, et al (2010) Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, Soil Pollut* 214:163-174. doi: 10.1007/s11270-010-0412-2
- Kim SC, Carlson K (2007) Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 387:1301-1315. doi: 10.1007/s00216-006-0613-0
- Knapp CW, Cardoza LA, Hawes JN, et al (2005) Fate and Effects of Enrofloxacin in Aquatic Systems under Different Light Conditions. *Environ Sci Technol* 39:9140-9146. doi: 10.1021/es050895l
- Koppenaal et al (2005) Mass Spectrometry detectors. *Anal Chem* 77:419A-27A. doi: 10.1063/1.3061259
- Kumar K, C. Gupta S, Chander Y, Singh AK (2005) Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. *Adv Agron* 87:1-54. doi: 10.1016/S0065-2113(05)87001-4
- Kümmerer K (2008) *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer 3:1-501.
- Kümmerer K (2003) Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother* 52:5-7. doi: 10.1093/jac/dkg293
- Kurwadkar ST, Adams CD, Meyer MT, Kolpin DW (2007) Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. *J Agric Food Chem* 55:1370-1376. doi: 10.1021/jf060612o
- Lee S et al (2016) Metronidazole-induced combined peripheral and central vestibulopathy. *J Neurol Sci* 365:31-33. doi: 10.1016/j.jns.2016.03.043
- Lehotay SJ (2011) QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods. *Methods Mol Biol* 747:65-91. doi: 10.1007/978-1-61779-136-9\_4
- Lertpaitoonpan W, Ong SK, Moorman TB (2009) Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* 76:558-564. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.02.066
- Lesueur C, Gartner M, Mentler A, Fuerhacker M (2008) Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta* 75:284-293. doi: 10.1016/j.talanta.2007.11.031
- Lewis RJ (2007) Liquid-liquid Extraction. *PreLab* 73-92. doi: 10.1002/9780470114735.hawley09899
- Li WC (2014) Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ Pollut* 187:193-201. doi: 10.1016/j.envpol.2014.01.015
- Li X, Xie Y, Wang J, et al (2013) Influence of planting patterns on fluoroquinolone residues in the soil of an intensive vegetable cultivation area in northern China. *Sci Total Environ* 458-460:63-69. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.002
- Lin CE, Deng YJ, Liao WS, et al (2004) Electrophoretic behavior and pK a determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 1051:283-290. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.069
- Lindholm J (2004) *Development and Validation of HPLC Methods for Analytical and Preparative Purposes* BY. Uppsala
- Lo S, Edlund C, Nord CE (2010) Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. doi: 10.1086/647939
- Luo Y, Xu L, Rysz M, et al (2011) Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the haihe River basin, China. *Environ Sci Technol* 45:1827-1833. doi: 10.1021/es104009s
- Macherey-Nagel (2012) *Solid Phase Extraction Application Guide*. 245.

- MacKay AA, Canterbury B (2005) Oxytetracycline sorption to organic matter by metal-bridging. *J Environ Qual* 34:1964-71. doi: 10.2134/jeq2005.0014
- Manzetti S, Ghisi R (2014) The environmental release and fate of antibiotics. *Mar Pollut Bull* 79:7-15. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.005
- Meersche T Van den, Pamel E Van, Poucke C Van, et al (2015) Development, validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. *J Chromatogr A* 1429:1-10. doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.046
- Meyer E, Gastmeier P, Deja M, Schwab F (2013) International Journal of Medical Microbiology Antibiotic consumption and resistance : Data from Europe and Germany. *Int J Med Microbiol* 303:388-395. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.04.004
- Michigan State University (2011) Antibiotics of Veterinary Importance. <http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/antibiotics-of-veterinary-importance>. Accessed 13 Jun 2016
- Miller JM, Miller JC (2010) Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. In: *Technometrics*. p 278
- Mojica E, Aga DS (2011) Antibiotics Pollution in Soil and Water : Potential Ecological and Human Health Issues. *Encycl Environ Heal* 97-110.
- Molyneux P (2014) Octanol/water partition coefficients Kow: A critical examination of the value of the methylene group contribution to logKow for homologous series of organic compounds. *Fluid Phase Equilib* 368:120-141. doi: 10.1016/j.fluid.2014.01.014
- Moreira MIDMCG (2010) Azóis: Farmacologia e Interações Medicamentosas. Porto
- Morel MC, Spadini L, Brimo K, Martins JMF (2014) Speciation study in the sulfamethoxazole-copper-pH-soil system: Implications for retention prediction. *Sci Total Environ* 481:266-273. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.040
- Niessen WM. (1998) Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 812:53-75. doi: 10.1016/S0021-9673(98)00281-7
- Ok YS, Kim SC, Kim KR, et al (2011) Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. *Environ Monit Assess* 174:693-701. doi: 10.1007/s10661-010-1625-y
- Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4943-60. doi: 10.1128/AAC.00296-11
- Parlamento Europeu (2013) Diretiva 2013/39/UE. *J Of da União Eur* 2013:1-17.
- Patrick DM, Marra F, Hutchinson J, et al (2004) Per capita antibiotic consumption: how does a North American jurisdiction compare with Europe? *Clin Infect Dis* 39:11-17. doi: 10.1086/420825
- Paul M, Bishara J, Yahav D, et al (2015) Trimethoprim-sulfamethoxazole versus vancomycin for severe infections caused by meticillin resistant *Staphylococcus aureus*: randomised controlled trial. *BMJ* 350:h2219. doi: 10.1136/bmj.h2219
- Pereira LA, Jardim ICSF, Fostier AH, Rath S (2012) Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. *Quim Nova* 35:159-169. doi: 10.1590/S0100-40422012000100028
- Petrovic M, Farré M, Lopez M, et al (2010) Recent trends in the liquid chromatography - mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. 1217:4004-4017. doi: 10.1016/j.chroma.2010.02.059
- Peysson W, Vulliet E (2013) Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1290:46-61. doi: 10.1016/j.chroma.2013.03.057
- Picó Y, Andreu V (2007) Fluoroquinolones in soil--risks and challenges. *Anal Bioanal Chem* 387:1287-99. doi: 10.1007/s00216-006-0843-1
- Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R (2009) QuEChERS - Um método moderno de preparo de

- amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim Nova* 32:1620-1634. doi: 10.1590/S0100-40422009000600046
- Qi C, Liu X, Lin C, et al (2014) Degradation of sulfamethoxazole by microwave-activated persulfate: Kinetics, mechanism and acute toxicity. *Chem Eng J* 249:6-14. doi: 10.1016/j.cej.2014.03.086
- Qiang Z, Adams C (2004) Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK<sub>a</sub>) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 38:2874-2890. doi: 10.1016/j.watres.2004.03.017
- Rahim ASA, Sayuti MIM, Hau KC, et al (2011) An Illustrated Review About Aminoglycosides. *Pharm Sci* 1-12. doi: 10.9754/journal.wmc.2011.002744
- Reeves PT (2011) Antibiotics: Groups and Properties. *Chem Anal Antibiot Residues Food* 1-60. doi: 10.1002/9781118067208.ch1
- Regitano J et al (2010) Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal Brasileira. *Rev Bras Cienc do Solo* 34:601-616. doi: 10.1590/S0100-06832010000300002
- Robert Baudot LW (2014) Comparison of Two Analytical Methods for the Determination of Traces of Veterinary Antibiotics and Steroid Hormones in Soil Based on Pressurised Liquid Extraction (PLE) and Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (Modified-Quechers) Extraction. *Pharm Anal Acta*. doi: 10.4172/2153-2435.1000315
- Russell L. Yeager BAH (1990) Sorption/desorption of [<sup>14</sup>C]jefrotomycin with soils. *J Agric Food Chem* 38:883-886. doi: 10.1021/jf00093a062
- Sabljić A, Gusten H, Verhaar H, Hermens J (1996) Corrigendum: QSAR modelling of soil sorption. Improvements and systematics of log k(OC) vs. log k(OW) correlations (*Chemosphere* (1995) 31 (4489-4514)). *Chemosphere* 33:2577. doi: 10.1016/S0045-6535(96)90050-8
- Salvia MV, Vulliet E, Wiest L, et al (2012) Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *J Chromatogr A* 1245:122-133. doi: 10.1016/j.chroma.2012.05.034
- Schwabe U et al (2001) *Arzneiverordnungs-Report 2001*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Schwarz J, Thiele-Bruhn S, Eckhardt K-U, Schulten H-R (2012) Sorption of Sulfonamide Antibiotics to Soil Organic Sorbents: Batch Experiments with Model Compounds and Computational Chemistry. *ISRN Soil Sci* 2012:1-10. doi: 10.5402/2012/159189
- Seo Y, Choi J, Kim S, et al (2007) Prioritizing Environmental Risks of Veterinary Antibiotics Based on the Use and the Potential to Reach Environment. 40:43-50.
- Shi W, Yue T, Du Z, et al (2016) Surface modeling of soil antibiotics. *Sci Total Environ* 543:609-619. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.077
- Shinn DLS (1962) METRONIDAZOLE IN ACUTE ULCERATIVE GINGIVITIS. *Lancet* 279:1191. doi: 10.1016/S0140-6736(62)92243-2
- Siddappa K, Mallikarjun M, Reddy PT, Tambe M (2008) Spectrophotometric determination of metronidazole through Schiff's base system using vanillin and PDAB reagents in pharmaceutical preparations. *Eclet Quim* 33:41-46. doi: 10.1590/S0100-46702008000400005
- Skoog D a., West DM, Holler FJ, Couch SR (2005) *Fundamentos de Química Analítica*. Fundam Química Analítica 58:374. doi: 10.1016/S0584-8547
- Sollicec M, Roy-Lachapelle A, Gasser MO, et al (2016) Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment. *Sci Total Environ* 543:524-535. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.061
- Spízek J, Novotná J, Rezanka T (2004) Lincosamides: chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications. *Adv Appl Microbiol* 56:121-54. doi: 10.1016/S0065-2164(04)56004-5
- Szewzyk R, Feuerpfeil I (2000) Antibiotic resistance in the environment. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg* 106:59-62.
- Tamtam F, van Oort F, Le Bot B, et al (2011) Assessing the fate of antibiotic contaminants in metal contaminated soils four years after cessation of long-term waste water irrigation. *Sci Total*

- Environ 409:540-547. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.10.033
- Tang X, Lou C, Wang S, et al (2015) Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: Evidence from four field experiments in south of China. *Soil Biol Biochem* 90:179-187. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.07.027
- Taylor MJ, Tanna S, Sahota T (2010) In vivo study of a polymeric glucose-sensitive insulin delivery system using a rat model. *J Pharm Sci* 99:4215-4227. doi: 10.1002/jps
- Teddy AA (2014) Faculty of Bioscience Engineering Pressurized liquid extraction and Orbitrap mass spectrometry analysis of pharmaceutical residues in wastewater treatment plant sludge. Gent
- Teixeira S, Delerue-Matos C, Santos L (2012) Removal of sulfamethoxazole from solution by raw and chemically treated walnut shells. *Environ Sci Pollut Res* 19:3096-3106. doi: 10.1007/s11356-012-0853-9
- Thiele-Bruhn S (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166:145-167. doi: 10.1002/jpln.200390023
- Thomas L, Wouter A (2006) THE EFFECT OF pH AND IONIC STRENGTH ON THE SORPTION OF ... doi: 10.1897/05-232R.1
- Tillotson GS (1996) Quinolones: Structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol* 44:320-324. doi: 10.1099/00222615-44-5-320
- Tonucci MC, Gurgel LVA, Aquino SF de (2015) Activated carbons from agricultural byproducts (pine tree and coconut shell), coal, and carbon nanotubes as adsorbents for removal of sulfamethoxazole from spiked aqueous solutions: Kinetic and thermodynamic studies. *Ind Crops Prod* 74:111-121. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.003
- UCT (2011) PESTICIDE RESIDUE ANALYSIS. Bristol
- Vaes WHJ, Freidig AP, Halling-sørensen B, Hermens JLM (2000) 1-Octanol / water distribution coefficient of oxolinic acid: influence of pH and its relation to the interaction with dissolved organic carbon. 40:711-714.
- Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, et al (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14:742-750. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7
- Vardanyan, R.; Hruby V (2016) Synthesis of Best-Seller Drugs. Acad. Press 573-643.
- Vera J, Correia-Sá L, Paíga P, et al (2013) QuEChERS and soil analysis. An Overview. *Sample Prep* 1:54-77. doi: 10.2478/sample-2013-0006
- Vulliet E, Cren-Olivé C (2011) Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ Pollut* 159:2929-2934. doi: 10.1016/j.envpol.2011.04.033
- Wang D, Curtis A, Papp AC, et al (2012) Polymorphism in glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) is associated with sulfamethoxazole-induced hypersensitivity in HIV/AIDS patients. *BMC Med Genomics* 5:32. doi: 10.1186/1755-8794-5-32
- Waters (2016a) SPE Method Development: Waters. [https://waters.com/waters/en\\_US/SPE-Method-Development/nav.htm?cid=10083845](https://waters.com/waters/en_US/SPE-Method-Development/nav.htm?cid=10083845). Accessed 2 Mar 2016
- Waters (2016b) QuEChERS Dispersive Solid Phase Extraction: Waters. [http://www.waters.com/waters/pt\\_PT/QuEChERS-Dispersive-Solid-Phase-Extraction/nav.htm?cid=10072671&locale=pt\\_PT](http://www.waters.com/waters/pt_PT/QuEChERS-Dispersive-Solid-Phase-Extraction/nav.htm?cid=10072671&locale=pt_PT). Accessed 4 Mar 2016
- Waters (2016c) The Science of What's Possible. [http://www.waters.com/waters/pt\\_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt\\_PT](http://www.waters.com/waters/pt_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_PT). Accessed 1 Mar 2016
- WHOCC (2013) ACTvet. Oslo
- Xie Y, Li X-W, Wang J-F, et al (2012) Spatial estimation of antibiotic residues in surface soils in a typical intensive vegetable cultivation area in China. *Sci Total Environ* 430:126-31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.071



# Anexo 1 - Material Complementar à Introdução

Tabela A1 1 - Marcos importantes na história dos antibióticos (Aminov et al. 2010)

Antibióticos - Marcos Históricos	
Antes de 1800	Início da procura dos antibióticos: aceitação da Teoria do Germe da Doença, teoria essa que aceitava como causa da variedade de doenças microrganismos como as bactérias e outros micróbios. Assim sendo, vários cientistas dedicaram o seu tempo na procura de 'drogas' capazes de combater esses organismos.
1871	O cirurgião Joseph Lister iniciou uma pesquisa sobre o fenómeno da urina contaminada não permitir o crescimento bem-sucedido de bactérias.
1890	Os médicos Rudolf Emmerich e Oscar Low foram os primeiros a fazer uma medicação eficaz a que chamaram <i>pyocyanase</i> de micróbios. Foi o primeiro antibiótico a ser utilizada em hospitais, contudo muitas das vezes não funcionou.
1928	Sir Alexander Fleming observou que as colónias de bactérias <i>Staphylococcus Aureus</i> eram destruídas pela <i>Penicillium Notatum</i> , demonstrando assim propriedades antibacterianas.
1935	O químico Gerhard Domagk descobriu a <i>Prontosil</i> , a primeira 'droga' derivada da sulfanilamida.
1942	Sir Alexander Fleming, Howard Florey e Ernst Chain receberam um prémio Nobel pelos seus trabalhos com a penicilina.
1943	O microbiólogo Selman Waksman preparou o medicamento estreptomicina a partir de bactérias do solo, o primeiro de uma nova classe de medicamentos chamados antibióticos aminoglicosídeos. A estreptomicina foi utilizada para tratar doenças como a tuberculose, no entanto, com efeitos colaterais, por vezes, demasiado graves.
1955	Tetraciclina foi patenteada por Lloyd Conover.
1957	Nistatina foi patenteada e utilizada para curar muitas infeções fúngicas desfigurantes e incapacitantes.
1981	SmithKline Beecham patenteou a Amoxicilina que foi vendida pela primeira vez como antibiótico em 1998 sob os nomes comerciais de Amoxicilina, Amoxil e Trimox.
1981- Atualidade	Muitos outros compostos foram aparecendo e ainda hoje em dia se estuda novos compostos capazes de combater doenças cada vez mais complexas.

## Anexo 2 - Material Complementar à Discussão de Resultados

### SPE

O sorvente de extração utilizado na extração por SPE foi *Oasis HLB* (Hydrophilic-Lipophilic Balance) e encontra-se ilustrado na Figura A<sub>2</sub> 1.

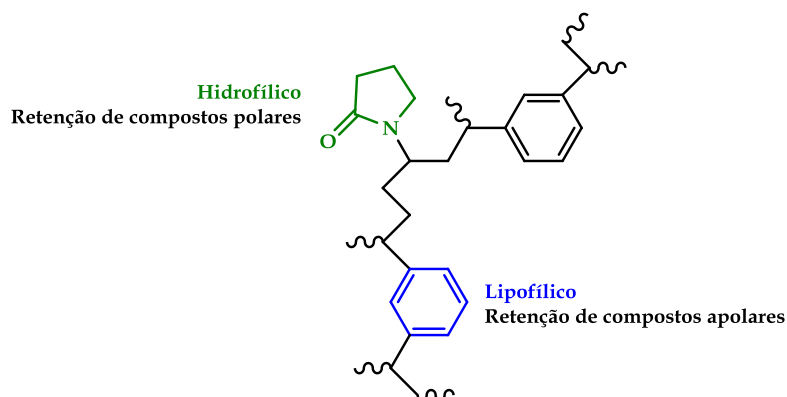


Figura A<sub>2</sub> 1- Estrutura química do sorbente Oasis HLB

### HPLC

A fase estacionária utilizada nas análises cromatográficas - HPLC - foi uma coluna *endcapped octadecyl C18*. Esta coluna é composta por partículas de gel de sílica e é utilizada para reter compostos apolares. A sua estrutura encontra-se ilustrada na Figura A<sub>2</sub> 2.

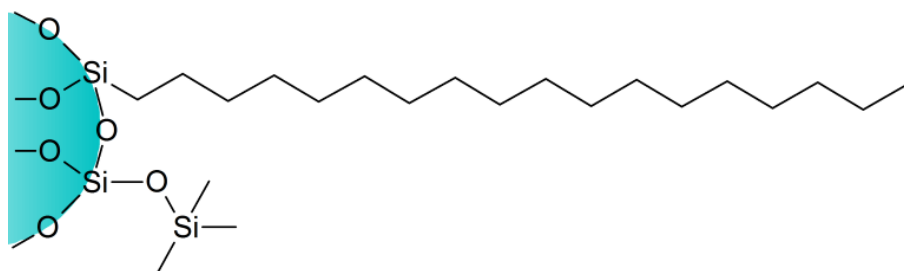


Figura A<sub>2</sub> 2 - Estrutura química sorbente C18